Enzymatische Peptidsequenzierung

A
Isolierung und Reinigung von
Dipeptidyl-Aminopeptidase IV (DAP IV)

B
Peptidsequenzierung mit DAP I/IV
und Analyse der Dipeptide mit GC/MS

Helmut Gonschor

Diss
München

Aus dem Max-Planck-Institut
für Biochemie in Martinsried

ENZYMATISCHE PEPTIDSEQUENZIERUNG

A ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON
DIPEPTIDYL-AMINOPEPTIDASE IV (DAP IV)
B PEPTIDSEQUENZIERUNG MIT DAP I / IV
UND ANALYSE DER DIPEPTIDE MIT GC / MS

Dissertation
der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Helmut Gonschor
aus München
am 28.3. 1984

Meinen Eltern

Meiner Familie

1. Berichterstatter : Prof. Dr. W. Schäfer
2. Berichterstatter : Prof. Dr. T. Severin

Tag der mündlichen Prüfung : 15.6. 1984

1. EINLEITUNG 1

1.1 Exopeptidasen 1

1.2 Dipeptidyl-Aminopeptidasen (DAP) 1

1.2.1 Dipeptidyl-Aminopeptidase I (DAP I) 1
1.2.2 Dipeptidyl-Aminopeptidase IV (DAP IV) 5

1.3 Polypeptidsequenzierung mit Dipeptidyl-Aminopeptidasen 10

1.4 Aufgabenstellung 11

2. MATERIAL UND METHODEN 12

2.1 Geräte 12

2.2 Chemikalien und biologisches Material 13

2.3 Proteinbestimmungen 14

2.3.1 Biuretmethode 14
2.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry 15

2.4 Aktivitätsbestimmungen 17

2.4.1 Aktivitätsbestimmung von Dipeptidyl-Aminopeptidase I (DAP I) 17

2.4.1.1 mit Glycyl-phenylalanin-p-nitroanilid (Gly-phe-p-NA) 17
2.4.1.2 mit Glycyl-phenylalanin-2-naphthylamid (Gly-phe-2-NNap) 20

2.4.2 Aktivitätsbestimmung von Dipeptidyl-Aminopeptidase IV (DAP IV) mit Glycyl-prolin-2-naphthylamid (Gly-pro-2-NNap) 23
2.4.3 Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität mit den Substraten Leu-2-naphthylamid (Leu-2-NNap) und Gly-2-naphthylamid (Gly-2-NNap) 25
2.4.4 Aktivitätsbestimmungen von DAP IV und Aminopeptidasen nach isoelektrischer Fokussierung (Polyacrylamid) mit Substrat und Fast Garnet GBC 27

2.5 Elektrophoresen 28

2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Plattengel-Elektrophorese 28
2.5.2 Disk-Elektrophorese ohne SDS 31
2.5.3 Dünnschicht-Elektrophorese 33

2.6 Isoelektrische Fokussierung 34

2.7 Dünnschichtchromatographie 35

2.8 Mikro-Dialyse 36

2.9 Aminosäureanalyse 36

2.10 Edman-Abbau 37

2.11 Enzymatische Spaltungen 37

2.11.1 Puffer 37
2.11.2 Spaltansätze und Blindwerte 38

2.12 Derivatisierung und Identifizierung der Aminosäuren und Dipeptide 38

2.12.1 Derivatisierung mit 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB) 38
2.12.2 Derivatisierung mit Methanol / Salzsäure und Perfluorpropionsäureanhydrid (MeOH/HCl und PFPA) 39
2.12.3 Derivatisierung mit Isopropanol / Salzsäure und Perfluorpropionsäureanhydrid (i.Prop./HCl und PFPA) 40

3. ERGEBNISSE und DISKUSSION

der Enzymanreicherungen von DAP IV und der Enzymcharakteristika 41

3.1 Vorausgehende Anreicherungen von DAP IV 41

3.2 Untersuchungen zur Anreicherung von DAP IV 42

3.2.1 Optimale Solubilisierung und fraktionierte Ammoniumsulfatfällung 42
3.2.2 pH-Stabilität und pH-Abhängigkeit 44
3.2.3 Temperatur-Abhängigkeit und -Stabilität 45

3.3 Schnellere und effektivere Anreicherungen von DAP IV ohne Affinitätschromatographie 47

3.4 Enzymanreicherung von DAP IV mit Affinitätschromatographie an Gly-pro-AH-Sepharose 48

3.4.1 Solubilisierung und fraktionierte Ammoniumsulfatfällung 48
3.4.2 Gelfiltration an AcA 34 (Polyacrylamid-Agarose-Gel) 50
3.4.3 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-cellulose 52 52
3.4.4 Gelfiltration an AcA 34 oder Verdünnen der vereinigten Fraktionen mit Aktivität mit der vierfachen Menge bidest. Wasser 55
3.4.5 Affinitätschromatographie 56

3.4.5.1 Herstellung von Glycyl-prolyl-Aminohexyl-Sepharose 4B (Gly-pro-AH-Sepharose) 57
3.4.5.2 Affinitätschromatographie an Gly-pro-AH-Sepharose 57

3.4.6 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-cellulose 52 61
3.4.7 Gelfiltration an AcA 34 oder Verdünnen der vereinigten Fraktionen mit Aktivität mit der zweifachen Menge bidest. Wasser 63
3.4.8 Konzentrierung an DEAE-cellulose 52 64

3.5 Affinitätschromatographie mit Lectinen oder mit Antikörpern 72

3.6 Vergleich der Reinheit von DAP IV aus den Anreicherungsverfahren mit und ohne Affinitätschromatographie 73

3.6.1 Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität nach dem letzten Anreicherungsschritt 73

3.6.1.1 Isoelektrische Fokussierung mit anschließender Bestimmung der DAP IV-Aktivität und der α-Aminopeptidase-Aktivität 73
3.6.1.2 Aktivitätsbestimmung mit Leu-2-NNap und Gly-2-NNap als Substrate 75
3.6.1.3 Aktivitätsbestimmung durch Nachweis von Aminosäuren mit GC / MS 76

3.6.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von DAP IV mit und ohne Affinitätschromatographie angereichert 77
3.6.3 Disk-Elektrophorese 78
3.6.4 Bestimmung des isoelektrischen Punktes 79

3.7 Molekulargewichtsbestimmungen 80

3.7.1 Bestimmung des MG vom nativen Enzym DAP IV durch Chromatographie an Sephadex G-200 80
3.7.2 Bestimmung des MG von denaturiertem DAP IV mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese 82

3.8 Vergleich der Enzymcharakteristika von DAP IV aus Schweinenieren mit denen in der Literatur 83

4. ZUSAMMENFASSUNG

der Enzymanreicherungen von DAP IV und der Enzymcharakteristika 85

5. DAP I 87

5.1 Synthese von Gly-phe-p-NA 88

6. ERGEBNISSE und DISKUSSION

der Peptidsequenzierungen 90

6.1 Ermittlung des pH-Optimums einer Mischung aus DAP I und DAP IV, für die Peptidsequenzierung 90

6.2 Untersuchung von Substanzen, die in den GC-Spektren zum erhöhten Untergrund beitragen 92

6.2.1 Abtrennung von Begleitstoffen der Enzyme DAP I und DAP IV 94
6.2.2 Bidest. Wasser vor und nach der Mikro-Dialyse 97

6.3 Blindwerte zur Identifizierung von Substanzen aus den Enzymreinigungen und aus den Spaltansätzen 99

6.4 Blindwerte mit Enzymen 102

6.5 Blindwerte mit Dipeptiden 102

6.6 Peptidspaltungen und Identifizierung der Dipeptide mit HPLC, Dünnschichtchromatographie und MS 107

6.7 Derivatisierung der durch enzymatische Hydrolyse entstandenen Spaltprodukte für die GC / MS - Analyse 109

6.7.1 Aminosäuren 109
6.7.2 Dipeptide 113

6.8 Peptidspaltungen und Identifizierung der Dipeptide mit GC / MS 117

6.9 Untersuchungen zur Empfindlichkeit der Methode anhand der Spaltung von Glucagon 146

6.10 Prüfung der Langzeitstabilität von Dipeptiden gegenüber DAP I und DAP IV 150

6.11 Untersuchung der Stabilität von Dipeptiden und den optimalen Derivatisierungsbedingungen 151

6.12 Peptidsequenzierung mit FAB - MS 154

7. ZUSAMMENFASSUNG

der Peptidsequenzierungen 160

Abkürzungen

g	Erdbeschleunigung
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
HCl	Salzsäure
DAP	Dipeptidyl-Aminopeptidase
DEAE	Diethylaminoethyl
SDS	Natriumdodecylsulfat
MG	Molekulargewicht
$(NH_4)_2SO_4$	Ammoniumsulfat
NaCl	Kochsalz
2-NNap	2-Naphthylamin
-2-NNap	-2-naphthylamid
p-NA	p-Nitroanilin
-p-NA	-p-nitroanilid
MeOH	Methanol
i.Prop.	Isopropanol
TMS-	Trimethylsilyl-
DNP-	Dinitrophenyl-
DNP	Dinitrophenol
DNFB	Dinitrofluorbenzol
DTT	Dithiothreitol
UpM	Umdrehungen pro Minute
GC	Gaschromatogramm (Gaschromatographie)
GC / MS	Gaschromatographie / Massenspektrometrie
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
DC	Dünnschichtchromatographie
R_f-Wert	Laufstrecke der Substanz : Abstand Start-Front
T_R	Raumtemperatur
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure

Die Aminosäuren werden nach der 3-Buchstaben-Regel abgekürzt. Mit dieser Bezeichnung ist auch immer die L-Konfiguration gemeint, wenn keine zusätzliche Angabe gemacht wird.

1. EINLEITUNG

1.1 Exopeptidasen

Exopeptidasen sind Peptidhydrolasen, die Peptide ausschließlich vom Amino- oder vom Carboxylende her abbauen. Die N-terminalen Exopeptidasen, die eine freie α-Amino- (oder α-Imino-) gruppe für ihren Angriff benötigen, werden als Aminopeptidasen (Iminopeptidasen) bezeichnet, wenn sie Aminosäuren freisetzen und als Dipeptidyl-Aminopeptidasen, wenn sie Dipeptide abspalten. Letztere werden auch als Dipeptidyl-Peptidhydrolasen bezeichnet (1).

1.2 Dipeptidyl-Aminopeptidasen (DAP)

Zu den bisher am besten untersuchten Dipeptidyl-Aminopeptidasen gehören : DAP I (EC 3.4.14.1), andere Bezeichnungen sind Dipeptidyl-Arylamidase I, Dipeptidyl-Transferase bzw. Cathepsin C (2) und DAP IV (EC 3.4.14.4), welche in der Literatur auch als Gly-Pro Naphthylamidase, Post-Pro Dipeptidyl-Aminopeptidase bzw. Dipeptidyl-Peptidase IV (2) bezeichnet wird.

1.2.1 Dipeptidyl-Aminopeptidase I (DAP I)

DAP I wurde 1948 von Gutman und Fruton (3) in Schweinenieren entdeckt, als ein Enzym, das die Spaltung (Deamidierung) von Gly-phe-amid katalysiert.
In den folgenden Jahren konnte DAP I aus weiteren Organen wie Rattenleber (4) , Rindermilz (5) und Rinderhypophyse (6)

isoliert und angereichert werden.
Das Enzym ist überwiegend in den Lysosomen lokalisiert.
DAP I spaltet im pH-Optimum 5-6 aus Peptiden unspezifisch Dipeptide ausschließlich vom freien Aminoende her ab (1). Besonders schnell werden Dipeptide mit Arg, Lys oder Phe an zweiter Stelle freigesetzt. Keine Spaltung erfolgt, wenn Lys bzw. Arg N-terminal stehen und/oder Pro an der zu spaltenden Peptidbindung beteiligt ist (1, 7-10). Außerdem muß die Aminosäure, die die Carboxylgruppe in die zu spaltende Peptidbindung einbringt, in der L-Konfiguration vorliegen (1, 11). Die aminoständige Aminosäure kann L- oder D-Konfiguration aufweisen (1, 12). Bei pH-Werten um 7 werden zusätzlich Dipeptide mit N-terminalem Arg oder Lys abgespalten (12-14). Zwischen pH 7 und 8 (bei einigen Autoren wird pH 6,8-7,7 angegeben) zeigt DAP I beträchtliche Transpeptidase-Aktivität (8, 15, 16) (daher auch der Name Dipeptidyl-Transferase), was sich in der Bildung von Tetra- und Oligopeptiden auswirkt.
Die Enzymaktivität von DAP I ist abhängig von der Chloridionenkonzentration und erfährt durch Verbindungen mit SH-Gruppen eine Aktivierung (1, 4, 17-22). Eine etwa 5 millimolare Lösung an Chloridionen ist für optimale Aktivität erforderlich. Zu hohe Chloridionenkonzentration wirkt inhibierend.
Das Enzym ist eine Thiolprotease, vollständige Hemmung erfolgt durch Jodessigsäure (Jodacetamid) bzw. p-Chloromercuribenzoat, jeweils in 1 millimolarer Lösung (23).
Als Substrate für das Enzym sind Gly-phe-p-nitroanilid und Gly-arg-p-nitroanilid bzw. die entsprechenden Naphthylamide am gebräuchlichsten.
Die physiologische Bedeutung von DAP I ist in vitro auf einigen Teilgebieten bereits erforscht. Die ursprüngliche Bezeichnung von DAP I als Cathepsin)[1] C und das Auffinden in

)[1] Der Name Cathepsin bedeutet "verdauen" und wurde 1928 von Willstätter und Bamann geprägt, für saure Proteinase-Aktivität in wäßrigen Extrakten tierischer Gewebe (24)

Lysosomen (25) geben Hinweise auf die schon früh nachgewiesene Proteinase-Aktivität. Huang und Tappel (26) haben 1971 gezeigt, daß lysosomale proteolytische Enzyme das Hauptsystem darstellen, das für den Proteinabbau und -umbau verantwortlich ist. Dabei haben die in den Lysosomen vorkommenden Enzyme Cathepsin D und C die größte Aktivität. Cathepsin D, das in Geweben sehr verbreitet ist, spaltet als Endopeptidase intakte Proteine in Peptidfragmente, die erst dann für Cathepsin C, als Exopeptidase, zur Spaltung in Dipeptide zugänglich sind. Während Cathepsin D nicht die Fähigkeit der Totalhydrolyse besitzt, zeigt Cathepsin C keine Aktivität gegenüber intakten Proteinen. Dieses Zusammenspiel von Cathepsin D und C wird durch die geringeren Aktivitäten von Cathepsin A und B ergänzt (4, 5, 21, 26).

DAP I spielt weiterhin eine wichtige Rolle in der Inaktivierung (Spaltung) von Glucagon und Insulin; letzteres wird aber erst nach Zerlegen in die Einzelketten A und B, vermutlich durch die Wirkung von Glutathion-Insulin-Transhydrogenase, für DAP I angreifbar. Die Tatsache, daß DAP I Glucagon abbaut, steht in Einklang mit dem hohen Enzymgehalt in der Leber, dem Wirkort des Glucagons. ACTH (adrenocorticotropic hormone) und in die Einzelketten zerlegtes Insulin wirken dabei als kompetitive Inhibitoren (4, 19, 25, 27). Möglicherweise übt DAP I auch durch die Spaltung von ACTH (wird in der Hypophyse synthetisiert, die ebenfalls reich an DAP I ist), Sekretin, Gastrin und Angiotensin regulatorisch auf diese Peptidhormone ein.

Die physiologische Bedeutung der Polymerisierungsreaktionen steht vermutlich in Zusammenhang mit dem Umbau von Peptiden (4, 19).

Über die Biosynthese von DAP I ist bisher noch wenig bekannt.

Der Mechanismus der Enzymkatalyse ist in einigen Einzelheiten geklärt. Bei der DAP I handelt es sich um eine Thiolprotease mit allosterischem Charakter (17), deren Cys im aktiven Zentrum eine ähnliche Funktion ausübt, wie Ser in

den Serinproteasen (siehe 1.2.2 DAP IV).

Die primäre Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat erfolgt möglicherweise an der α-Aminogruppe des Substrates und zwingt die Aminosäureseitenkette des zweiten Restes in die Enzymebene, wodurch eine Konformationsänderung im aktiven Zentrum des Enzyms hervorgerufen wird, die eine effektivere Katalyse ermöglicht (10). Diese Konformationsänderung wird durch Kofaktoren (wie z.B. Halogenide) ermöglicht, die für die Enzymkatalyse notwendig sind. Dabei wird ein Ladungsbeitrag zum aktiven Zentrum diskutiert, der dem Substrat bei der Umwandlung des Enzyms in einen katalytisch aktiven Zustand behilflich ist (19, 27). Aktivatoren (Verbindungen mit SH-Gruppen) halten die Cys-Seitenkette für diesen Schritt vermutlich im reduzierten Zustand und haben somit auch aktivitätserhöhende Wirkung (21). Andere Effektoren (z.B. aromatische Verbindungen oder Amine) haben je nach der durch das Enzym katalysierten Reaktion und je nach Substrat aktivierende oder inhibierende Wirkung (10).

Bei der Enzymkatalyse erfolgt entweder Hydrolyse oder Transamidierung bzw. Polymerisierung (Transferierung). Welche Reaktion bevorzugt abläuft, hängt ab vom pH der Lösung und vom pK_a der korrespondierenden NH_4^+-Gruppen der Substrate (4, 15) : Bei pH <6 überwiegt die Hydrolyse-Aktivität und bei pH 7-8 überwiegt die Transferase-Aktivität. Diese durch das Enzym katalysierten Reaktionen geschehen vermutlich durch kooperative Wirkung der katalytischen Zentren der insgesamt acht Untereinheiten von DAP I (15, 28). Dieses Zusammenwirken ist noch ungeklärt. Es wird vermutet, daß eine Reaktion zwischen benachbarten Untereinheiten erfolgt, wobei die eine als Donor und die andere als Akzeptor wirkt (14, 15). Während bei der Hydrolyse das Produkt an Wasser gebunden wird, erfolgt bei der Transferierung Kopplung an ein Substratmolekül. Bei der Polymerisierung kann diese Reaktion so lange fortgesetzt werden, wie die entstandenen Produkte löslich sind (5, 14, 15). Unter Abspaltung des Produktes entsteht ein Acylenzym.

Vom Deacylierungsschritt wird angenommen, daß er geschwindigkeitsbestimmend ist (21).
Das Enzym DAP I wurde von Boehringer Mannheim gekauft. Bei den durchgeführten Peptidspaltungen zeigte sich, daß in dieser Enzympräparation Aminopeptidase als Nebenaktivität vorhanden ist.

1.2.2 Dipeptidyl-Aminopeptidase IV (DAP IV)

Hopsu-Havu und Glenner (29) beobachteten 1966 erstmals die Hydrolyse von Gly-pro-2-naphthylamid in Gly-Pro und 2-Naphthylamin als Nebenaktivität in einer käuflich erworbenen Enzympräparation mit Acylase-Aktivität aus Schweinenieren. Enzymanreicherungen aus Rattenleber (Hopsu-Havu und Sarimo (30)) und Schweineniere (Hopsu-Havu et al. (31)) ergaben, daß es sich hierbei um ein Enzym handelt, das Gly-Pro als Dipeptideinheit vom freien Aminoende aus Oligopeptiden abspaltet (27).
DAP IV konnte inzwischen aus verschiedenen tierischen Organismen angereichert und charakterisiert werden : aus Schweineniere (31-36), Leber (34, 37), Ovarien (38) und Bauchspeicheldrüse (39, 40), aus der Ohrspeicheldrüse vom Rind (41), aus Lammniere (42), aus Rattenleber (30, 43) und Rattenhirn (44) und aus der Bienengiftdrüse (45). Zudem liegen mehrere histochemische Studien über das Vorkommen von DAP IV in verschiedenen Organen von Schwein, Kaninchen, Katze, Hamster, Maus, Meerschweinchen und Ratte vor (46-48). Auch in menschlichen Geweben wurde DAP IV nachgewiesen und aus einigen Organen sogar angereichert : Unterkieferdrüse (49, 50), Speicheldrüse (Speichel) (51), Markflüssigkeit (52), Lymphgewebe (53), Niere (54), Muskel (55), Gehirn (56), Serum (57, 58), Haut (59) und Urin (60). Neuerdings gelang auch der Nachweis von DAP IV in Mikroorganismen, wie : Flavobacterium meningosepticum (61, 62), Saccharomyces cerevisiae (63, 64) und Streptococcus mitis (65).
DAP IV ist überwiegend in den Mikrosomen lokalisiert. Das Enzym spaltet bei unterschiedlichen pH-Optima (je nach

biologischer Herkunft) Dipeptide ausschließlich vom freien Aminoende her ab (1, 65). Es werden grundsätzlich nur Dipeptide mit Pro oder Ala in gerader Position freigesetzt. Keine Spaltung erfolgt, wenn als N-terminale Sequenz X-Pro-Pro- oder X-Pro-Hyp- (X = Aminosäure) auftritt (7, 50, 66, 67). Außerdem spaltet das Enzym nicht, wenn eine oder beide Aminosäuren des abzuhydrolisierenden Dipeptids in der D-Konfiguration vorliegen (32).

Eine Transferase-Aktivität des Enzyms ist bisher nicht bekannt geworden. Kofaktoren (z.B. Ionen oder chemische Modifizierungsreagentien, die die enzymatische Aktivität positiv beeinflussen) sind für die DAP IV-Aktivität nicht erforderlich (31, 32, 47, 67).

Die am häufigsten für das Enzym verwendeten Substrate sind : Gly-pro-2-naphthylamid, Gly-pro-4-methoxy-2-naphthylamid, Gly-pro-p-nitroanilid und 7-(Gly-pro)-4-methylcoumarinamid. Vereinzelt ist auch die Verwendung dieser Derivate von Pro-Pro, Lys-Pro, Ala-Pro und Phe-Pro beschrieben (32, 68). Den N-terminalen Aminosäuren ist dabei im wesentlichen eine Rolle bei der Ausprägung der Spezifität zuzuschreiben, während die nachfolgende Aminosäure in Position 2 die Selektivität bewirkt und entscheidet, ob eine Hydrolyse stattfindet oder nicht (32).

Die physiologische Bedeutung des Enzyms ist trotz zahlreicher Untersuchungen noch unklar. Wegen der hohen Selektivität für die Abspaltung von Gly-Pro als Dipeptid wurde schon früh die Vermutung geäußert, daß das Enzym am Kollagenstoffwechsel beteiligt sei (31, 69). Dabei ist die Hydrolyse der, durch Kollagenase-Abbau entstandenen, Fragmente denkbar (51). Die hohe DAP IV-Aktivität in den Speicheldrüsen und im Speichel (41, 49, 51) kann auch in diesem Zusammenhang gesehen werden, da Kollagen das Hauptgewebe in Mund und Zahnfleisch darstellt. Ebenso erklärt dies den hohen Enzymgehalt in der Haut (59, 70), die auch reich an Kollagen ist. Bisher konnte aber weder eine direkte Beteiligung am Kollagen-Stoffwechsel, noch eine erhöhte DAP IV-Aktivität bei Patienten mit Kollagen-Stoff-

wechselerkrankungen nachgewiesen werden (58).
Ferner werden eine Mitwirkung bei der Endverdauung von Peptiden im Dünndarm diskutiert (32, 48, 71) und eine Funktion im Zusammenhang mit dem Aminosäure- bzw. Peptidtransport durch Membranen (33, 72).
1978 wurde von Heymann und Mentlein (73), sowie Kato et al. (74) beschrieben, daß DAP IV in der Lage ist, von der Substanz P schrittweise die beiden N-terminalen Dipeptide Arg-Pro und Lys-Pro abzuspalten. Da das verbleibende Heptapeptid stärkere neuroaktive Wirkung zeigt, könnte DAP IV für die Aktivierung von Substanz P eine Rolle spielen. In diesem Zusammenhang wurden Untersuchungen über die DAP IV-Aktivität von verschiedenen Geweben und Organen durchgeführt (70, 75). Daraus ergibt sich eine mögliche Beziehung zum Substanz-P-Metabolismus : Umwandlung des neuroaktiven Peptides in eine kürzere Sequenz mit verstärkter Wirkung an den Orten des Angriffs von Substanz P und Beteiligung an der Inaktivierung des Peptides in der Leber (70, 73, 74).
Die N-terminale Freisetzung von Peptiden aus Vorstufen (Prepro-Peptide) durch DAP IV und die damit einhergehende Bildung kürzerer Peptide mit stark veränderter Wirkung konnte bereits in mehreren Organismen in vivo und in vitro nachgewiesen werden : Prepro-α-Faktor → α-Faktor (aus Hefe) (64), Pro-Melittin → Melittin (aus der Bienengiftdrüse) (45) und Prepro-Caerulein → Caerulein (aus der Froschhaut) (76).
Noch nicht abschätzbar ist der Wert des Enzyms als diagnostisches Werkzeug im Frühstadium einiger Erkrankungen beim Menschen. Die Korrelation zwischen stark veränderter DAP IV-Aktivität im Serum und besonderen Krankheiten oder Gruppen von Krankheiten wird noch untersucht. Sicher ist inzwischen eine erhöhte DAP IV-Aktivität im Serum bei Lebererkrankungen (z.B. Gelbsucht, Leberkrebs, Hypertonie (57, 77-79)) und im Urin von Nierenkranken (60) und erniedrigte DAP IV-Aktivität im Serum bei verschiedenen Blutkrankheiten (z.B. Lymphosarcoma, Hodgkin'sche Krankheit (80)) und Magenkrebs (57, 81). Der Nachweis von DAP IV-

Isoenzymen bei Lebererkrankungen (57, 81-84) könnte dann noch eine zusätzliche Hilfe darstellen.
Über die Biosynthese von DAP IV ist noch wenig bekannt (85-87).
Der Mechanismus der Enzymkatalyse dagegen ist bereits in einigen Einzelheiten untersucht. Bei der Wechselwirkung des Substrates mit dem aktiven Zentrum des Enzyms entsteht zunächst ein Erkennungskomplex, der in eine tetrahedrale Zwischenstufe übergeht. Bei der Spaltung des Substrates wird ein Acylenzym als Zwischenprodukt gebildet, das aus Enzym und Dipeptid besteht. Der abhydrolysierte Substratrest diffundiert vom aktiven Zentrum weg. Die Deacylierung des Enzyms erfolgt nach dem umgekehrten Mechanismus wie die Acylierung, mit einem Wassermolekül als Reaktionspartner (88). Am Katalysemechanismus ist neben einer Serinhydroxylgruppe ein Imidazolrest (His) beteiligt. Die Lage des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes ist für Substrate der Alaninreihe und denen der Prolinreihe verschieden (88-90). Eine mögliche Erklärung für die kompetitive Hemmung des Enzyms durch Substrate wie X-Pro-Pro- oder X-Pro-Hyp- (X = Aminosäure) ist, daß, aufgrund des Pyrrolidinringes in Position drei, die Annäherung der Amidbindung an das aktive Zentrum, in dem sich der Serinrest befindet, gestört ist (91). Das Enzym ist eine Serinprotease, vollständige Inhibierung erfolgt durch 1 mMol Diisopropylphosphofluoridat (DIPF) (31, 32, 47, 61).

Zur Gruppe der Dipeptidyl-Aminopeptidasen gehören noch weitere drei Enzyme (DAP II, III und V), die nach Substratspezifität, Substrat zum Nachweis des Enzyms und pH-Optimum unterschieden werden können. Die Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der bisher bekannten Dipeptidyl-Aminopeptidasen und einige ihrer Merkmale.

Tabelle 1

	Substratspezifität	Assay-Substrat	pH-Optimum	Herkunft	Klassifizierung
DAP I	spaltet relativ unspezifisch nacheinander Dipeptide vom Aminoende her aus Polypeptid-substraten ab	Gly-phe-2-NNap Gly-arg-2-NNap	5,0-6,0 (Hydrolase) 7,0-8,0 (Transpeptidase)	Lysosomen	Thiolprotease
DAP II)[a]	spaltet N-terminal Dipeptide ab, einschließlich einiger mit Pro an 2. Stelle, aus Di- und Tripeptiden mit beschränkter Spezifität, bevorzugt, wenn Pro oder Ala an 2. Stelle	Lys-ala-2-NNap	5,0-6,0	Lysosomen	Serinprotease
DAP III	spaltet mit beschränkter Spezifität nacheinander Dipeptide, vom Aminoende her, aus Polypeptiden ab	Arg-arg-2-NNap	8,0-9,0	Cytosol	Serinprotease ?
DAP IV)[a]	spaltet nacheinander N-terminal Dipeptide aus Polypeptiden, bevorzugt wenn Pro an 2. Stelle, keine Spaltung von X-Pro-Pro- oder X-Pro-Hyp-	Gly-pro-2-NNap	7,5-8,5	Mikrosomen (Membran)	Serinprotease
DAP V)[b]	spaltet Dipeptide N-terminal, wenn Pro an 2. und/oder 3. Stelle steht	Phe-pro-2-NNap	5,0-6,0		Serinprotease

)[a] Die pH-Optima der beiden Enzyme DAP II und DAP IV liegen so weit auseinander, daß keine Störung beim Nachweis mit den Assay Substraten erfolgt.

)[b] DAP V ist noch nicht näher charakterisiert worden.

1.3 Polypeptidsequenzierung mit Dipeptidyl-Aminopeptidasen

1969 beschrieben MacDonald et al. (25) erstmals die Anwendung von DAP I zur enzymatischen Sequenzierung von Peptiden. Inzwischen werden die Spaltungen meist mit einer Mischung aus DAP I und DAP IV durchgeführt. Dadurch sind alle Peptide vom Aminoende her abbaubar, wenn nicht Pro oder Hyp an ungerader Stelle innerhalb des Peptides auftritt. Diese Hürde kann dann durch einen Edman-Abbau oder eventuell durch Mitverwendung von DAP V von Anfang an genommen werden. Durch eine nachfolgende Spaltung des verkürzten Peptides mit dem Enzymgemisch, nach einem vorausgehenden Edman-Schritt, erhält man die überlappenden Dipeptide. Bei sich wiederholenden Dipeptideinheiten können zusätzlich aus den Spaltansätzen in verschiedenen Zeitabständen Proben entnommen werden (13, 92-94).
Der Nachweis der Dipeptide kann erfolgen mit : Papierchromatographie (30, 58, 95), Dünnschichtchromatographie (71), Säulenchromatographie (95), Dünnschichtelektrophorese (96-98) oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) (39, 99). Eine eindeutige Identifizierung der ca. 400 möglichen Dipeptide durch jeweils nur eine der vorgenannten Methoden ist nicht möglich. Selbst bei Kombination zweier oder mehrerer dieser Methoden ist in der Regel eine zusätzliche Aminosäureanalyse erforderlich. Dies bedeutet, neben dem apparativen Aufwand, vor allem einen erheblichen zeitlichen Aufwand. Neue hochselektive Nachweismethoden erlaubten nun, daß man das Problem der Dipeptididentifizierung von neuem angeht. Durch Verwendung der Gaschromatographie / Massenspektrometrie (GC/MS) (13, 92, 93) sollten alle Dipeptide eindeutig und in kurzer Zeit identifizierbar sein. Dazu ist nach der Enzymspaltung eine Derivatisierung der Dipeptide erforderlich. Anschließend erfolgt Auftrennung des Dipeptidgemisches im Gaschromatographen und Identifizierung

der einzelnen Peaks im gekoppelten Massenspektrometer. Bisher wurden mit DAP I bzw. DAP IV, einzeln oder in Mischung, Sequenzierungsversuche an folgenden Proteinen und Peptiden durchgeführt : Spinat Plastocyanin (8), Insulin A und B Kette vom Rind (100, 101), Glucagon (25, 101), Sekretin (25), β-Corticotropin (ACTH) (19), Angiotensin II (11, 102), Gastrin (103), Ameletin (104), Ribonuclease S (7, 99), Trypsin Inhibitor (7), Pro-Melittin (45), Substanz P (73, 74), Hefe-α-Faktor (64), Val-4-Angiotensin III (99) und β-Casomorphin-5 (105).

1.4 Aufgabenstellung

Das Enzym DAP IV sollte unter Berücksichtigung neuerer Trennmethoden angereichert werden. Dabei lag die Hauptaufgabe darin, eine, für die später durchzuführende Peptidsequenzierung, an störender Nebenaktivität freie Enzympräparation zu erhalten. Das erarbeitete Verfahren sollte es ermöglichen, jeweils in kurzer Zeit (wenigen Wochen) für zahlreiche Sequenzierungsversuche, Enzym nachzuliefern. Das Enzym DAP I (Boehringer Mannheim) sollte auf eventuell störende Nebenaktivität geprüft und anschließend zusammen mit DAP IV zur Peptidsequenzierung eingesetzt werden. Hierbei war eine schnelle (wenige Stunden) und eindeutige Identifizierung der Spaltprodukte als PFP-Dipeptid-(Aminosäure-)methylester mit GC / MS angestrebt. Durch eine ständige Volumenverkleinerung der Spaltansätze war es notwendig geworden, die Blindwerte der möglichen Störsubstanzen genauer zu beschreiben. Dabei standen vor allem die verwendeten Puffersubstanzen, Stoffe, die aus der Dialysemembran herausgelöst werden und Verbindungen, die in den Enzympräparationen enthalten sind zur Untersuchung an. Diese Versuche waren die Voraussetzung für eine Steigerung der Empfindlichkeit in den Bereich 1 - 10 nMol.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte

Mixer (Ultra Turrax Typ T45/N)
Sorvall RC2-B Zentrifuge
Stock Zentrifuge
Wkf-Zentrifuge G50K
Tischzentrifuge Christ Typ UJ1
pH-Meter Potentiograph Metrohm Modell E336
Eppendorf Photometer Modell 1101M mit Fluorometerzusatz
Zeiss Spektralphotometer PM6
Fraktionssammler ISCO Modell 328
Durchflußphotometer Shimadzu Bausch & Lomb spectronic 210 UV und UV-210A
Automatische Probengeber Struers Scientific Instruments Denmark, Automatic changer for liquid samples
Ultrafiltrationszellen Amicon Modell 402, Diaflo^{R}-Membranen UM 10 / PM 30 / YM 30
Mikropipetten Assistent und Brand
Reacti-vials Pierce
Geräte für isoelektrische Fokussierung von LKB : Power Supply 2103 und Multiphor 2117-010
Vakuum-Zentrifuge Savant
IR-Gerät Perkin Elmer 197
HPDC linear Entwicklungskammer Nr. 28510 Camag
HPLC-Anlage LDC Milton-Roy, Detektor LDC UV III
GC Fractovap 2101AC Carlo Erba Milano, Säulen CP Sil 5 und OV 1701 Chrompac Middelburg
Massenspektrometer CH7A Varian
Geräte, Eigenbau des Max-Planck-Institutes :
Plattengel-Elektrophorese-Apparatur
Disk-Elektrophorese-Apparatur
Apparatur für horizontale Dünnschichtelektrophorese

2.2 Chemikalien und biologisches Material

Markermix für die Elektrophorese : Myosin (Kaninchenmuskel), β-Galactosidase (E. coli), Phosphorylase A (Kaninchenmuskel), Ovalbumin (Huhn) und Serumalbumin (Rind)
Proteine für die Chromatographie an Sephadex G-200 : Apoferritin (Pferdemilz), Catalase (Rinderleber), β-Globulin (Humanserum), Serumalbumin (Rind) und Cytochrom c (Pferdeherz)
N,N,N',N'-Tetramethyl-äthylendiamin (TMED) reinst, N,N'-Methylenbisacrylamid reinst, Acrylamid 2x krist. p.A., Coomassie Brillant Blue R-250, Natriumdodecylsulfat (SDS), Fast Garnet GBC, Gly-phe-2-NNap, Leu-2-NNap, Gly-2-NNap, Gly-Pro, Glucagon und Trypsin TPCK-behandelt (Serva)
Gly-phe-p-NA (Boehringer Mannheim)
Gly-pro-2-NNap (Bachem)
DEAE-cellulose 52 (Whatman)
Sephadex G-200, Sephadex G-25 fine, Sephadex G-15 und AH-Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals)
Ultrogel Hydroxylapatit (HA) (Nr 2204-110), Ultrogel AcA 34 (Nr 2204-340), Polyacrylamidgele Ampholine^{R} PAGplate pH 3,5-9,5 (Nr 1804-101) und pH 4,0-6,5 (Nr 1804-102) (LKB)
Mercaptoäthanol (Carl Roth, Karlsruhe)
Bidest. Wasser (Baker)

Alle übrigen Chemikalien wurden von E. Merck, Darmstadt bezogen und waren von p.A. Qualität

Alle Arbeiten wurden mit bidest. Wasser durchgeführt.

Die Schweinenieren wurden frisch vom Schlachthof bezogen.

2.3 Proteinbestimmungen

2.3.1 Biuretmethode

Die Proteinbestimmung nach der Biuretmethode erfolgte in Anlehnung an die Methode von Beisenherz et al. (106).

Biuretreagens :

400 ml 0,2 N Natronlauge
9 g Kalium-natrium-tartrat x 4 H_2O
3 g Kupfersulfat x 5 H_2O
5 g Kaliumjodid

mit 0,2 N Natronlauge auf 1 Liter auffüllen; in brauner Flasche im Kühlschrank aufbewahren.

Durchfuhrung der Bestimmung : (in 10 ml Reagenzgläsern)

x ml Probelösung (enthaltend 1-5 mg Protein)
+ bidest. Wasser ad 1 ml
+ 0,2 ml 3 Mol Trichloressigsäure (TCA)

5 Minuten bei 3000 UpM zentrifugieren
nach Entfernen der überstehenden Lösung
+ 2,5 ml bidest. Wasser
+ 2,5 ml Biuretreagens

durch Schütteln (oder Wirlmix) ausgefälltes Protein wieder in Lösung bringen.

Blindwert : 2,5 ml bidest. Wasser
+ 2,5 ml Biuretreagens

Nach 30 Minuten Extinktion messen bei 546 nm gegen Blindwert.

Eichkurve :
Die mit Bovine Serumalbumin (BSA) erstellte Eichkurve ist zwischen 1 und 5 mg Protein linear (Abb. 1).

2.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry (107) wurde entsprechend der Modifizierung nach Markwell et al. (108) durchgeführt.

Lösung A : 18,0 g Natriumcarbonat
1,4 g Natriumtartrat
9,0 g Natriumdodecylsulfat (SDS)
mit bidest. Wasser auf 1000 ml bringen.

Lösung B : 3,6 g Kupfersulfat x 5 H_2O
mit bidest. Wasser auf 100 ml bringen.

Lösung A und B sind bei Raumtemperatur stabil.

Lösung C : jeweils frisch herstellen
Lösung A : Lösung B = 100 : 1 mischen

Lösung D : jeweils frisch herstellen
Folin-Ciocalteus-Phenolreagens (Merck) :
bidest. Wasser = 1 : 1 mischen

Durchführung der Bestimmung : (in 10 ml Reagenzgläsern)
x ml Probelösung (enthaltend 2-20 µg Protein)
+ bidest. Wasser ad 0,2 ml
+ 1 ml Lösung C, während man gleichzeitig auf dem Wirlmix mischt
15 Minuten stehen lassen
+ 0,1 ml Lösung D, während man gleichzeitig auf dem Wirlmix mischt
nach 45 Minuten Extinktion bei 750 nm messen.

Blindwert :

0,2 ml bidest. Wasser

+ 1 ml Lösung C (zugeben wie oben)

nach 15 Minuten

+ 0,1 ml Lösung D (zugeben wie oben)

nach 45 Minuten messen.

Eichkurve :

Die mit Bovine Serumalbumin (BSA) erstellte Eichkurve ist zwischen 2 und 20 µg Protein annähernd linear (Abb. 2).

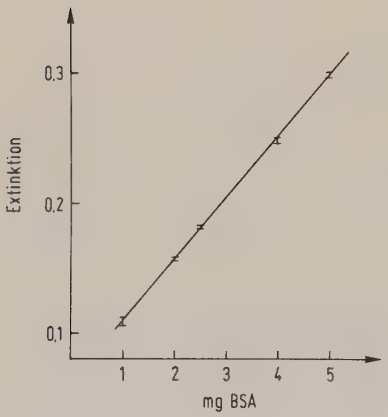


Abb. 1
Eichkurve für Biuret-Proteinbestimmung mit Bovine Serumalbumnin

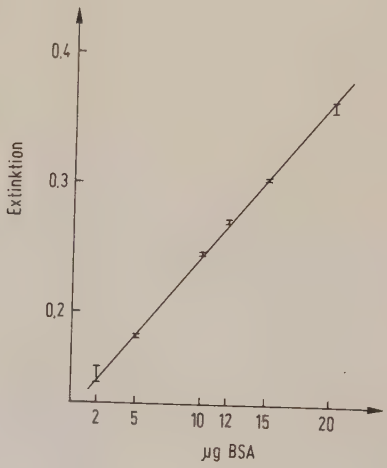


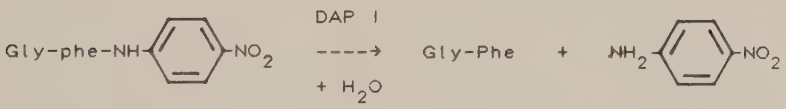
Abb. 2
Eichkurve für Lowry-Proteinbestimmung mit Bovine-Serumalbumin

2.4 Aktivitätsbestimmungen

2.4.1 Aktivitätsbestimmung von Dipeptidyl Aminopeptidase I (DAP I)

2.4.1.1 mit Glycyl-phenylalanin-p-nitroanilid (Gly-phe-p-NA)

Die Bestimmung der Aktivität von DAP I mit Gly-phe-p-NA erfolgt nach einer Vorschrift von Boehringer Mannheim (109).



Gemessen wird die Absorptionszunahme bei 405 nm (Abb. 3).

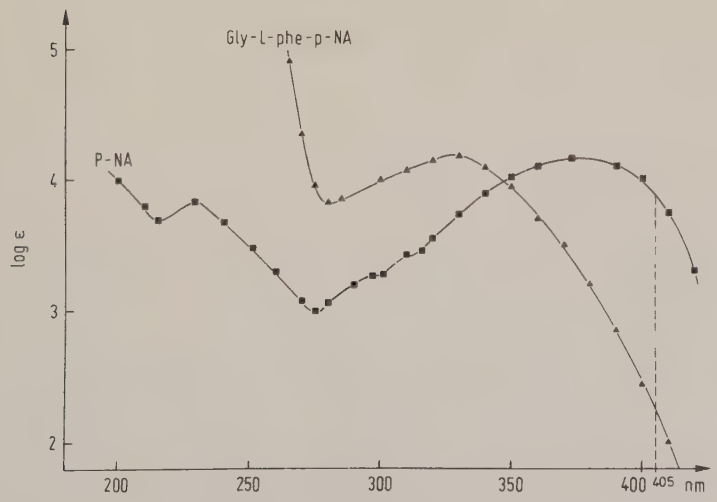


Abb. 3 Absorptionsspektren von Gly-phe-p-NA und p-NA in Äthanol

Für die Bestimmung werden folgende Lösungen frisch hergestellt :

Natriumcitratpuffer :

Lösung A : Citronensäure x H_2O (0,5 Mol in bidest. Wasser)

Lösung B : tri-Natriumcitrat x H_2O (0,5 Mol in bidest. Wasser)

Lösung C : Lösung B vorlegen und mit Lösung A auf pH 5,0 einstellen

Lösung D : Natriumchlorid (1,0 Mol in bidest. Wasser)

Lösung E : 10 ml Lösung C
+ 1 ml Lösung D
+ 113,6 mg Cysteamin x HCl
mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen.

Substratlösung : Gly-phe-p-NA (4 mMol) bei 37° C in wenig Dimethylformamid lösen und mit Lösung E auffüllen.

Messung : (gegen Blindwert (Bw))
verwendetes Gerät : Zeiss Spektralphotometer PM6
Wellenlänge : 405 nm
Temperatur : 37° C

In 1 cm Glasküvetten pipettieren	Probe	Bw_{Probe}	$Bw_{Reagentien}$
Substratlösung	3,00 ml	- . -	3,00 ml
bidest. Wasser	- . -	3,00 ml	0,05 ml

mischen, warten bis Extinktion konstant ist, dann Reaktion starten durch Zugabe von

Enzymlösung (Probelsg.)	0,05 ml	0,05 ml	- . -

mischen, bei 37° C im Wasserbad oder im temperierten Küvettenschlitten inkubieren.

Nach 1, 2, 3, 4 und 5 Minuten Extinktionen von Probe und Blindwerten ablesen.

Definition der Aktivität :
Die Aktivität 1 Unit (U) des Enzyms DAP I liegt vor, wenn in 1 Minute bei pH 5,0 und 37° C genau 1 µMol Gly-phe-p-NA hydrolisiert wird (103, 110).

Berechnung der Aktivität :
Für jede Messung

$$E = \frac{E_{Probe} - (E_{Bw\ (Probe)} + E_{Bw\ (Reagentien)})}{Minuten}$$

berechnen.

Die Aktivität (A) ergibt sich dann durch Einsetzen in folgende Formel :

$$A = \frac{V}{\varepsilon \times v \times d} \times E \times F \quad U/ml\ Enzymlösung$$

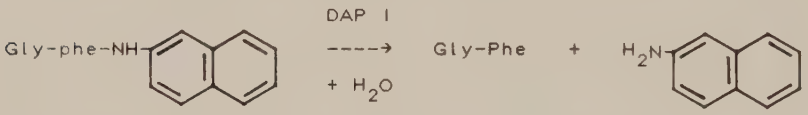
$$= \frac{3,05}{9,9 \times 0,05 \times 1} \times E \times F \quad U/ml\ Enzymlösung$$

$$= 6,16 \times E \times F \quad U/ml\ Enzymlösung$$

V Gesamtvolumen in der Küvette (hier 3,05 ml)
ε molarer Extinktionskoeffizient von p-NA (9,9)
v Volumen der zugegebenen Enzymlösung (Probelösung, hier 0,05 ml)
d Schichtdicke der Küvette (1 cm)
E Extinktion, nach obiger Formel berechnet
F Verdünnungsfaktor (falls Probe verdunnt wurde)

2.4.1.2 mit Glycyl-phenylalanin-2-naphthylamid (Gly-phe-2-NNap)

Die Bestimmung der Aktivität mit Gly-phe-2-NNap wird nach der Methode von MacDonald et al. (103) durchgeführt.



Die Anregung erfolgt bei 313 und 366 nm, gemessen wird die Zunahme der Transmission bei 400 - 3000 nm (Abb. 4).

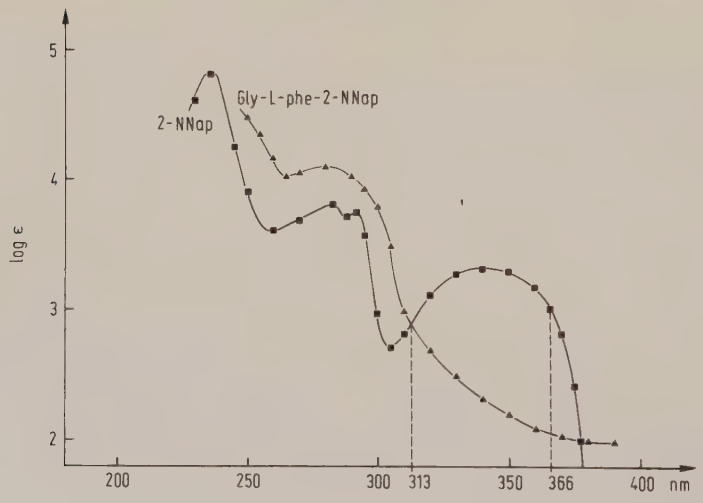


Abb. 4 Absorptionsspektren von Gly-phe-2-NNap und 2-NNap in Äthanol

Für die Bestimmung werden folgende Lösungen frisch hergestellt :

Eichlösung (Standard) : 2-NNap x HCl (1 µMol in Puffer)

Puffer	:	Cysteamin x HCl (30 mMol) und Dimethylarsinsäure-natriumsalz (50 mMol in bidest. Wasser, mit Salzsäure bzw. Natronlauge auf pH 6,0 einstellen).
Substratlösung	:	Gly-phe-2-NNap (0,25 mMol in bidest. Wasser)

Messung :

verwendetes Gerät	:	Eppendorf Photometer mit Fluorometerzusatz
Anregung	:	Hg 313 und 366 nm (Primärfilter)
Fluoreszenzmessung	:	400 - 3000 nm (Sekundärfilter)
Temperatur	:	37° C
Stufenschalter	:	eine Stufenschaltung entspricht einer Verstärkung bzw. Abschwächung von 1,87
Eichung des Gerätes	:	bei einer bestimmten Stufenschaltung 0,00 % Transmission (T) (Abgleich mit Substratlösung) und 1,00 % T (Abgleich mit Eichlösung) mit Feinabgleich einstellen. Feineinstellung während der Aktivitätsmessung nicht mehr verändern.

Aktivitätsmessung :

In 1 cm Glasküvetten pipettieren	Probe	Bw_{Probe}	$Bw_{Reagentien}$
Substratlösung	3,2 ml	- . -	3,2 ml
Puffer	0,7 ml	- . -	0,7 ml
bidest. Wasser	- . -	3,9 ml	0,1 ml

mischen, warten bis Extinktion konstant ist,
dann Reaktion starten durch Zugabe von

Enzymlösung (Probelsg.) 0,1 ml 0,1 ml - . -

mischen, bei 37° C im Wasserbad oder im temperierten Küvettenschlitten inkubieren.
Nach einer Minute % T von Probe und Blindwert ablesen.

Definition der Aktivität :
Die Aktivität 1 Unit (U) des Enzyms DAP I liegt vor, wenn in 1 Minute bei pH 5,0 und 37° C genau 1 µMol Gly-phe-2-NNap hydrolisiert wird (103).

Berechnung der Aktivität :
Für jede Messung

$$T = T_{Probe} - (T_{Bw\ (Probe)} + T_{Bw\ (Reagentien)})$$

berechnen.
Die Aktivität (A) ergibt sich durch Einsetzen in folgende Formel :

$$A = \frac{V \times 0{,}001}{v \times d} \times 1{,}87^{a} \times F \times T \quad \text{U/ml Enzymlsg.}$$

$$= \frac{4{,}0 \times 0{,}001}{0{,}1 \times 1} \times 1{,}87^{a} \times F \times T \quad \text{U/ml Enzymlsg.}$$

$$= 0{,}04 \times 1{,}87^{a} \times F \times T \quad \text{U/ml Enzymlsg.}$$

V	Gesamtvolumen in der Küvette (hier 4,0 ml)
0,001	Faktor, der sich aus der Eichung der Skala ergibt
v	Volumen der zugegebenen Enzymlösung (Probelösung, hier 0,1 ml)
d	Schichtdicke der Küvette (1 cm)
$1{,}87^{a}$	1,87 ist der Faktor für eine Stufenschaltung a entspricht der Anzahl der Schaltungen zur

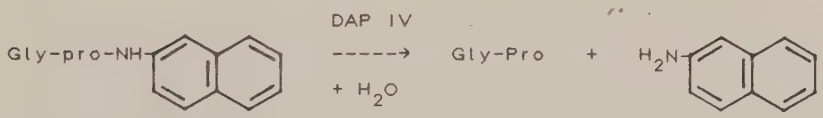
Abschwächung (Stufenschaltung Richtung 1), das bedeutet $\times 1{,}87 / \times 1{,}87^2 / \times 1{,}87^3 / \ldots$
oder zur Verstärkung (Stufenschaltung Richtung 10), das bedeutet $\times 1{,}87^{-1} / \times 1{,}87^{-2} / \times 1{,}87^{-3} / \ldots$

F Verdünnungsfaktor (falls Probe verdünnt wurde)

T Transmission, nach obiger Formel berechnet

2.4.2 Aktivitätsbestimmung von Dipeptidyl-Aminopeptidase IV (DAP IV) mit Glycyl-prolin-2-naphthylamid (Gly-pro-2-NNap)

Die Aktivität des Enzyms DAP IV mit Gly-pro-2-NNap wird nach der Methode von Kenny et al. (33) bestimmt.



Die Anregung erfolgt bei 313 und 366 nm, gemessen wird die Zunahme der Transmission im Bereich 400 - 3000 nm (Abb. 5).

Für die Bestimmung werden folgende Lösungen frisch hergestellt :

Eichlösung (Standard)	:	2-NNap x HCl (20 µMol in Puffer)
Puffer	:	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) (0,1 Mol in bidest. Wasser, mit Salzsäure auf pH 8,0 einstellen)
Substratlösung	:	Gly-pro-2-NNap (0,2 mMol in Puffer)
Messung	:	wie unter 2.4.1.2 beschrieben

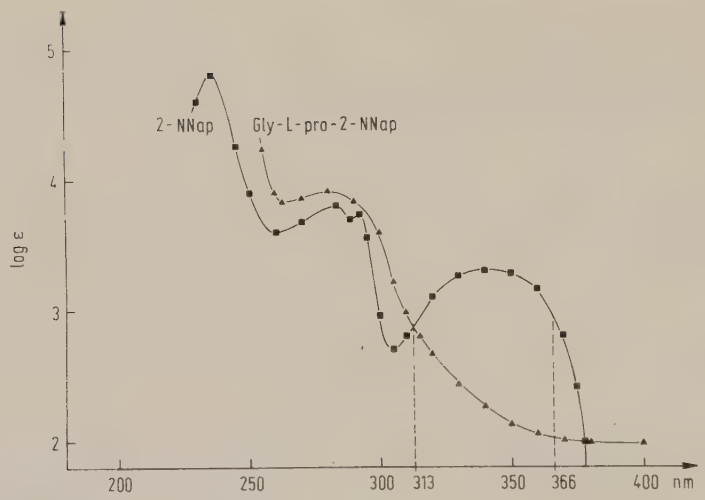


Abb. 5 Absorptionsspektren von Gly-pro-2-NNap und 2-NNap in Athanol

Aktivitätsmessung :

In 1 cm Glaskuvetten pipettieren	Probe	Bw_{Probe}	$Bw_{Reagentien}$
Substratlösung	1,9 ml	- . -	1,9 ml
bidest. Wasser	- . -	1,9 ml	0,1 ml

mischen, warten bis Extinktion konstant ist, dann Reaktion starten durch Zugabe von

Enzymlösung (Probelsg.)	0,1 ml	0,1 ml	- . -

mischen, bei 37° C im Wasserbad oder im temperierten Küvettenschlitten inkubieren.
Nach 1 Minute % T von Probe und Blindwerten ablesen.

Definition der Aktivität :
Die Aktivität 1 Unit (U) des Enzyms DAP IV liegt vor, wenn in 1 Minute bei pH 8,0 und 37° C genau 1 µMol Gly-pro-2-NNap hydrolisiert wird (33, 49, 58).

Berechnung der Aktivität :
Die Berechnung erfolgt wie unter 2.4.1.2 beschrieben, mit folgenden Änderungen : Gesamtvolumen in der Küvette (V) = 2,0 ml und Faktor, der sich aus der Eichung der Skala ergibt = 0,02.

2.4.3 Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität mit den Substraten Leu-2-naphthylamid (Leu-2-NNap) und Gly-2-naphthylamid (Gly-2-NNap)

Die Aminopeptidase-Aktivität wird mit Leu-2-NNap und Gly-2-NNap bestimmt, entsprechend den Angaben von Vitale et al. (111) und Nagatsu et al. (112).

Leu-2-NNap —Aminopeptidase→ Leu + 2-NNap

Gly-2-NNap + H_2O Gly + 2-NNap

FÜr die Bestimmung werden folgende Lösungen frisch hergestellt :

Eichlösung (Standard) : 2-NNap x HCl (20 µMol in Puffer)

Puffer : Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) (0,1 Mol in bidest. Wasser, mit Salzsäure auf pH 7,0 einstellen)

Substratlösungen :
a) Leu-2-NNap (0,2 mMol in Puffer)
b) Gly-2-NNap (0,2 mMol in Puffer)

Die Anregung erfolgt wiederum bei 313 und 366 nm, gemessen wird die Zunahme der Transmission im Bereich 400 - 3000 nm (Abb. 6).

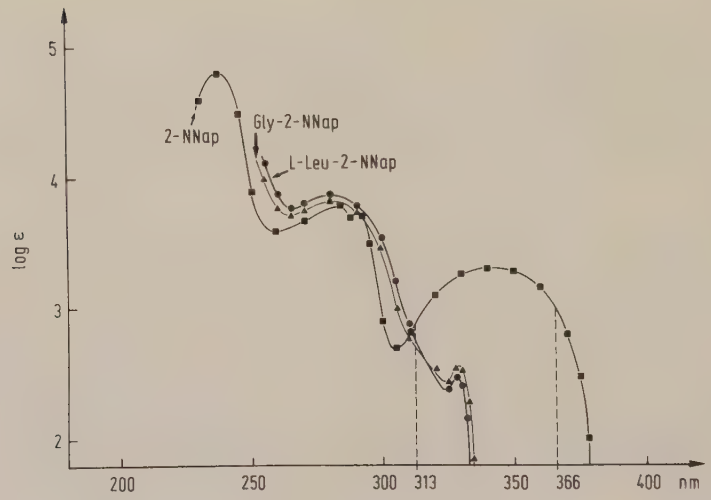


Abb. 6 Absorptionsspektren von Leu-2-NNap, Gly-2-NNap und 2-NNap.

Messung :
Die Messung der Aminopeptidase-Aktivität erfolgt wie im Kapitel 2.4.1.2 beschrieben.

Definition der Aktivität :
Die Aktivität 1 Unit (U) einer Aminopeptidase liegt vor, wenn in 1 Minute bei pH 7,0 und 37° C genau 1 µMol 2-NNap aus Leu-2-NNap bzw. Gly-2-NNap freigesetzt wird (111).

Berechnung der Aktivität : wie bei DAP IV beschrieben.

2.4.4 Aktivitätsbestimmungen von DAP IV und Aminopeptidasen nach isoelektrischer Fokussierung (Polyacrylamid) mit Substrat und Fast Garnet GBC

Die Aktivitätsbestimmungen von DAP IV und Aminopeptidase werden mit den Substraten Gly-pro-2-NNap und Leu-2-NNap bzw. Gly-2-NNap durchgeführt (29, 42, 69). Die isoelektrische Fokussierung erfolgt wie im Kapitel 2.6 beschrieben.

Durchführung :
Für die isoelektrische Fokussierung wird jede Probe dreimal parallel und auf gleicher Höhe auf das Gel aufgetragen. Am Rand des Geles, wenn mehrere verschiedene Proben aufgetragen werden, auch in der Mitte des Geles, wird ein breiter Streifen frei gelassen. Da das Gel auf einer Folie aufpolymerisiert ist, können mit einer Skalpellklinge Bahnen ins Gel geschnitten werden, für die einzelnen Proben und Blindwerte. Nach der isoelektrischen Fokussierung wird das Gel entsprechend den aufgetragenen Proben und ihren Wanderungsrichtungen (siehe markierte Bahnen) in Streifen geschnitten.
Die Streifen des angegebenen Beispiels werden wie folgt verwendet :

Nr 1, 10, und 19	: zur Bestimmung des pH-Gradienten (siehe 2.6 isoelektrische Fokussierung)
Nr 9	: für Blindwert mit Gly-pro-2-NNap
Nr 11	: für Blindwert mit Leu-2-NNap und Gly-2-NNap
Nr 3 und 13	: für Färbung mit Coomassie Brillant Blue (siehe 2.6 isoelektrische Fokussierung)
Nr 5 und 15	: für Bestimmung der DAP IV-Aktivität mit Gly-pro-2-NNap
Nr 7 und 17	: für Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität mit Leu-2-NNap und Gly-2-NNap

Bestimmung der Blindwerte und der Enzymaktivitäten mit den angegebenen Substraten und Fast Garnet GBC :

Die Gelstreifen werden in 0,5 cm lange Stückchen zerschnitten und auf durchnummerierte, mit Chromschwefelsäure gereinigte, Spitzreagenzgläser (10 ml Zentrifugengläser) verteilt. Je Glas wird 1,0 ml Puffer (Tris/HCl 0,1 Mol) zugegeben, anschließend beläßt man über Nacht auf der Schüttelmaschine. Nach Zugabe von 0,5 ml Substratlösung wird zwei Stunden bei 37° C inkubiert. Der, durch Zusetzen von 0,5 ml Fast Garnet GBC-Lösung (0,5 mg/ml), entstehende Farbstoff wird nach 30 Minuten bei 550 nm gegen den Blindwert gemessen.

Blindwert :
Dazu werden 0,5 cm lange Gelstücke ohne Protein mit 1,0 ml Puffer (Tris/HCl 0,1 Mol) über Nacht geschüttelt, mit 0,5 ml bidest. Wasser zwei Stunden bei 37° C inkubiert und mit 0,5 ml Fast Garnet GBC-Lösung (0,5 mg/ml) versetzt.
Für die Bestimmung des Blindwertes mit Leu-2-NNap und Gly-2-NNap bzw. der Aminopeptidase-Aktivitäten mit den gleichen Substraten, wird Puffer pH 7,0 verwendet. Für die entsprechenden Versuche mit Gly-pro-2-NNap wird Puffer pH 8,0 verwendet. Die Substratkonzentrationen für die Aktivitätsbestimmungen sind jeweils 0,25 millimolar.

2.5 Elektrophoresen

2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Plattengel-Elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen wurden vertikal in Plattengelen (130 x 115 x 16 mm) mit einer im Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, hergestellten Apparatur durchgeführt. Durch das Detergens SDS werden die Proteine in die sie bildenden Untereinheiten (Polypeptidketten) zerlegt (112). Es entstehen negativ geladene Protein-SDS-Komplexe, die in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Molekulargewichten aufgetrennt werden (113-115).

Herstellung eines Gradientengeles :
Zwischen zwei Glasplatten wird eine Mischung zweier Gellösungen von unten her so eingepumpt, daß von oben nach unten ein exponentieller Gradient von 25-5 % Acrylamid entsteht. Die Zusammensetzung der Gellösungen entspricht den Angaben von Laemmli (116), im einzelnen sind sie in Tabelle 2 beschrieben. Das Gradientengel wird anschließend mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation wird das Wasser abgegossen und ein weitmaschiges Obergel aufpolymerisiert (Zusammensetzung in Tabelle 2 angegeben). Durch einen Kunststoffkamm, der von oben zwischen die Glasplatten gedrückt wird, werden die Taschen zum Auftragen der Proben gebildet.

Tabelle 2 Zusammensetzung der einzelnen Gellösungen für die SDS-Polyacrylamid-Plattengel-Elektrophorese

Lösungen	5 % Trenngel	25 % Trenngel	3 % Sammelgel
1 Mol Tris/HCl pH 8,8	7,5 ml	7,5 ml	- . -
1 Mol Tris/HCl pH 6,8	- . -	- . -	0,62 ml
bidest. Wasser	8,36 ml	3,75 ml	3,68 ml
10 % SDS	0,2 ml	0,2 ml	0,05 ml
30 % Acrylamid + 0,8 % Bis)[1]	3,34 ml	- . -	0,5 ml
60 % Acrylamid + 1,6 % Bis)[1]	- . -	8,4 ml	- . -
5 % TMED)[2]	0,2 ml	0.05 ml	0,05 ml
15 mg Per)[3] pro ml bidest. Wasser	0,4 ml	0,1 ml	0,1 ml

)[1] Bis : N,N'-Methylenbisacrylamid
)[2] TMED : N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
)[3] Per : Ammoniumperoxodisulfat

Als Probenpuffer wurde verwendet :

1 Mol Tris/HCl pH 6,8	(121,1 g/Ltr)	0,65 ml
10 %ige SDS-Lösung		3,0 ml
Mercaptoäthanol		0,5 ml
Glycerin		1,0 ml
0,1 %ige Bromphenolblaulösung		1,0 ml

mit bidest. Wasser auf 10 ml auffüllen.

Alle für SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen bestimmte Proben aus den einzelnen Anreicherungsschritten wurden sofort nach der Entnahme mit dem gleichen Volumen Probenpuffer versetzt und zwei Minuten im siedenden Wasserbad denaturiert, anschließend wurden sie bei -20° C aufbewahrt.

Als Elektrodenpuffer wird der Tris-Glycin-Puffer (pH 8,3) nach Laemmli (116) eingesetzt. Die Zusammensetzung ist :

0,025 Mol Tris	(3,0 g/Ltr)	
0,192 Mol Glycin	(14,4 g/Ltr)	ergibt pH 8,3-8,4
0,1 % SDS	(1,0 g/Ltr)	

Die Elektrophorese wird bei Raumtemperatur durchgeführt, bei 300 V / 30 mA über einen Zeitraum von 2,5-3 Stunden. Die Proteine wandern dabei, als negativ geladene Protein-SDS-Komplexe, von der Kathode (oben) zur Anode (unten).
Die Gele werden nach der Elektrophorese ca. zwei Stunden bei Raumtemperatur in dem nachstehend beschriebenen Färbebad angefärbt :

1,1 g Coomassie Brillant Blue
200 ml Methanol
40 ml Eisessig
200 ml bidest. Wasser

Entfärbung erfolgt in einer Lösung aus :

7,5 % Eisessig
5,0 % Methanol
87,5 % bidest. Wasser

für ca. 48 Stunden.

Zur Überprüfung des exponentiellen Polyacrylamid-Gradienten und zur Abschätzung der Lage der Enzymbanden wird zusätzlich eine Mischung von Markerproteinen aufgetragen (Markermix für die Elektrophorese, unter 2.2 angegeben). Denaturierung erfolgt, wie bei den Proben, mit Probenpuffer (2 Minuten im siedenden Wasserbad).

2.5.2 Disk-Elektrophorese ohne SDS

Die Disk-Elektrophoresen werden in Glasröhrchen (0,5 x 20 cm bzw. 0,5 x 10 cm) mit einer im Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, hergestellten Apparatur durchgeführt.

Herstellung des Geles :
Die Glasröhrchen werden unten doppelt mit Parafilm verschlossen, anschließend wird bis etwa 1 cm unter den oberen Glasrand luftblasenfrei eine Trenngel-Lösung eingefüllt (Zusammensetzung siehe Tabelle 3) und vorsichtig mit bidest. Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation wird das Wasser abgegossen und eine Sammelgel-Lösung aufgetragen (Tabelle 3). Bis zum Abschluß der Polymerisation werden die Röhrchen mit Parafilm abgedichtet. Die Zusammensetzung der Gellösungen entspricht den Angaben von Maurer (117) und Laemmli (116).
Statt der Sammelgel-Lösung nach Maurer kann auch die Sammelgel-Lösung nach Laemmli verwendet werden. Zusammensetzung siehe Tabelle 2, ohne SDS, 3 %iges Gel, pH 6,8.
Als Probenpuffer und Elektrodenpuffer werden verwendet :

0,005 Mol Tris (0,6 g/Ltr)
ergibt pH 8,3
0,384 Mol Glycin (2,88 g/Ltr)

Dem Elektrodenpuffer im oberen Puffergefäß werden ein paar Tropfen 0,1 %ige Bromphenolblaulösung zugesetzt. Bromphenolblau wandert im Gel den Proteinen voraus und zeigt das Ende der Elektrophorese an. Die Proteine wandern von der Kathode (oben) zur Anode (unten). Die Elektrophorese erfolgt

Tabelle 3 Zusammensetzung der einzelnen Gellösungen für die Disk-Elektrophorese

Nr	Trenngel-Lösung (Bestandteile pro 100 ml Lösung)			Mischungsverhältnis für 7,5 %ige Lösung
	1 N HCl	48,0 ml		
1	Tris	36,6 g	pH 8,9	1
	TMED)[1]	0,23 ml		
2	Acrylamid	30,0 g		2
	Bis)[2]	0,8 g		
3	Per)[3]	0,14 g		4
4	bidest. Wasser			1

Nr	Sammelgel-Lösung (Bestandteile pro 100 ml Lösung)			Mischungsverhältnis für 2,5 %ige Lösung
	1 N HCl	48,0 ml		
5	Tris	5,98 g	pH 6,9	1
	TMED)[1]	0,46 ml		
6	Acrylamid	10,0 g		2
	Bis)[2]	2,5 g		
7	Riboflavin	4,0 mg		1
8	Saccharose	40,0 g		4

)[1] : N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
)[2] : N,N'-Methylenbisacrylamid
)[3] : Ammoniumperoxodisulfat

bei Raumtemperatur, anfangs mit 1 mA pro Gel, nach Wanderung der Proben in das Trenngel hinein wird auf 2-5 mA pro Gel erhöht. Die Elektrophoresedauer beträgt mehrere Stunden, je nach Länge der verwendeten Gelröhrchen.
Die Gele werden nach der Elektrophorese ca. zwei Stunden bei Raumtemperatur angefärbt und ca. vier Tage entfärbt, mit den im vorherigen Kapitel (2.5.1) beschriebenen Lösungen.

2.5.3 Dünnschicht-Elektrophorese

Die Dünnschichtelektrophoresen (96-98) werden mit einem im Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, hergestellten Gerät durchgeführt.
Die Platte (Kieselgel mit bzw. ohne Fluoreszenzindikator $F_{254\ nm}$) wird vor dem Auftüpfeln der Proben durch Auskratzen der Schicht in Bahnen eingeteilt, damit keine Vermischung der Proben während des Laufes eintritt. Nach dem Auftragen wird die Platte mit Elektrophoresepuffer besprüht, so daß sie gleichmäßig feucht ist, aber nicht glänzt. Die verwendeten Puffer sind 0,1 N Kalium-dihydrogenphosphat pH 3,5 bzw. 4,5. Die Elektrophorese wird bei 10° C durchgeführt, bei 450 V / 55 mA über einen Zeitraum von drei Stunden. Anschließend wird die Platte 10 Minuten bei 110° C getrocknet.
Die Detektion erfolgt mit Ninhydrin oder Fluorescamin.

1) Besprühen mit Ninhydrin 0,1 %ig (Merck)
   10 Minuten bei 110° C trocknen
2) Besprühen mit Fluorescamin
   a) besprühen mit 0,05 Mol Natriumborat pH 10,5
   b) 15 Minuten bei 110° C trocknen
   c) besprühen mit Fluorescamin (20 mg / 100 ml Aceton)
   d) 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
   e) Fluoreszenz betrachten bei Bestrahlung mit Licht im Wellenlängenbereich von 250-400 nm (blaugrüne Fluoreszenz der primären Aminosäuren)

f) besprühen mit 2-Aminoäthansulfonsäure (0,2 Mol) in 0,02 Mol Natriumphosphat pH 7,5

g) 10 Minuten bei 60° C trocknen

h) Fluoreszenz betrachten bei Bestrahlung mit Licht im Wellenlängenbereich von 250-400 nm (blaugrüne Fluoreszenz der sekundären Aminosäuren, primäre Aminosäuren sind nicht mehr zu sehen)

i) durch Wiederholen von a) bis e) erhält man eine intensivere Fluoreszenz der sekundären Aminosäuren

2.6 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrischen Fokussierungen werden mit den Geräten D.C. Power Supply 2103 und Multiphor 2117-010 sowie Polyacrylamidgelen von LKB durchgeführt, nach den Angaben in der Application Note 320 (118).
Bei dieser Methode erfolgt Auftrennung der Proteine, entsprechend ihren isoelektrischen Punkten. Während der ersten 30 Minuten des Laufes werden Spannung und Leistung begrenzt (500 V und 20 W), nach dem Entnehmen der Filterpapierstückchen zur Probenaufgabe wird für weitere 90 Minuten bei 2000 V Spannung und 20 Watt Leistung fokussiert. Zur Anfärbung der Proben und zur Bestimmung des pH-Gradienten werden aus dem Gel Streifen herausgeschnitten, entsprechend den Laufrichtungen der Proben, wie es in 2.4.4 bereits beschrieben wurde. Die Streifen mit Probe werden sofort nach dem Zerschneiden des Geles in eine Fixierlösung (200 g TCA in 1 Liter bidest. Wasser) gegeben und 30 Minuten leicht geschwenkt. Anschließend wird gefärbt mit folgender Mischung :

Lösung 1 : 10 g Kupfersulfat in
800 ml bidest. Wasser lösen
+ 200 ml Eisessig
(bei Raumtemperatur stabil)

Lösung 2 : 3 g Coomassie Brillant Blue in
900 ml Methanol lösen
+ 100 ml bidest. Wasser
(bei Raumtemperatur stabil)

Mischung (Färbebad) :
jeweils frisch herstellen !
Lösung 1 : Lösung 2 = 1 : 1

Nach 30 Minuten wird im Entfärbebad :
10 g Kupfersulfat in
1300 ml bidest. Wasser lösen
+ 200 ml Eisessig
+ 500 ml Methanol

so lange entfärbt, bis der Hintergrund klar ist.
Für die Bestimmung des pH-Gradienten werden die in 0,5 cm lange Stückchen zerschnittenen Gelstreifen auf durchnummerierte, mit Chromschwefelsäure gereinigte, Spitzreagenzgläser (10 ml Zentrifugengläser) verteilt und jeweils 1,0 ml entgastes bidest. Wasser dazugegeben. Nach etwa zweistündigem Schütteln wird für jedes Gläschen der pH-Wert bestimmt.

2.7 Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der DNP-Dipeptide und die Uberprüfung der Abtrennung von Reaktionsprodukten erfolgt vertikal in der HPDC Linear-Entwicklungskammer von Camag an Kieselgel $F_{254\ nm}$ im Laufmittelsystem : Chloroform, Tetrahydrofuran, Eisessig (10 / 2 / 0,3). Detektion erfolgt im UV-Licht (Fluoreszenzlöschung).

2.8 Mikro-Dialyse

Die Mikro-Dialyse wird nach der Methode von Budowle et al. (119) durchgeführt, in einer im Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried hergestellten Apparatur. Vor der Dialyse müssen die Dialyseschläuche (Ausschlußgrenze MG 10 000) dreimal abwechselnd mit 0,1 N Natriumhydrogencarbonat-Lösung (8,4 g/Ltr.) ca. fünf Minuten gekocht und mit bidest. Wasser gespült werden und anschließend zweimal abwechselnd mit 5mMol EDTA-Lösung (Titriplex III) (1,9 g/Ltr.) ca fünf Minuten gekocht und ebenfalls mit bidest. Wasser gespült werden. Anschließend werden 3 x 3 cm große Membranen zurechtgeschnitten und diese etwa 10 x, jeweils 10 Minuten, mit bidest. Wasser ausgekocht. Die Membranen werden um beidseitig offene Glasröhrchen (oder 100 µl Pipetten) gewickelt und so durch die Bohrungen in der Teflonscheibe geführt, daß unterhalb Probentäschchen entstehen. Mit einer GC-Spritze kann nun die Probe (3-50 µl) durch das Glasröhrchen hindurch (dient als Führungshülse) in das Probentäschchen eingefüllt werden, wobei gleichzeitig das Glasröhrchen herausgezogen wird. Auf die Plexiglasplatte wird eine Teflonscheibe aufgelegt und mit Schrauben befestigt. Es wird zwei Stunden gegen bidest. Wasser dialysiert. Zur Probenentnahme wird die Dialysemembran nach oben herausgezogen und die Probe mit einer 25 µl Pipette aus dem Täschchen entnommen.

2.9 Aminosäureanalyse

Für die Aminosäureanalysen (120-122) werden die Peptide (Proteine) nach dem Lyophilisieren in 6 N HCl gelöst, für 24 Stunden bei 110° C hydrolisiert und zur Trockene gebracht. Die Durchführung der Aminosäureanalysen mit dem Gerät Konrad Liquimat III erfolgt entsprechend den Angaben von J.R. Benson (122). Dabei findet ein iso-pH Puffer System Anwendung, das, wegen der nur geringen pH-Unterschiede der

einzelnen Puffer, ein Ansteigen der Grundlinie verhindert. Die Eluierung der Aminosäuren wird durch zunehmende Konzentration an Natriumionen ermöglicht. Die Reaktionsprodukte aus Ninhydrin und primärem bzw. sekundärem Amin werden bei 570 bzw. 440 nm gemessen. Zur Identifizierung und zur Berechnung der Konzentration der einzelnen Aminosäuren wird ein Aminosäurestandard eingespritzt, der je Aminosäure bzw. modifizierte Aminosäure 5 nMol enthält.

2.10 Edman-Abbau

Beim Edman-Abbau erfolgt Abspaltung der N-terminalen Aminosäure. Nach einer zweiten enzymatischen Spaltung desselben Peptides können somit die überlappenden Dipeptide erhalten werden. Die Durchführung erfolgt nach einer Praktikumsvorschrift für den manuellen Edman-Abbau aus der Abteilung Braunitzer, Max-Planck-Institut für Biochemie.

2.11 Enzymatische Spaltungen

Für die enzymatischen Spaltungen werden alle verwendeten Glasgeräte mit Chromschwefelsäure gereinigt.

2.11.1 Puffer

Die folgenden Puffer werden jeweils vor Gebrauch frisch hergestellt :

Puffer A (8) : 4,0 ml Pyridin 4 %ig
+ 7,9 ml bidest. Wasser
+ 4,0 ml Essigsäure 0,5 %ig
+ 3,2 ml Salzsäure 0,1 n
+ 0,2 ml Titriplex III-Lösung 0,1 Mol
+ 0,8 ml Mercaptoäthanol 0,375 M

Für die Spaltung mit DAP IV und DAP I oder DAP I alleine wird der pH-Wert mit Pyridin (4 %ig) oder Essigsäure (0,5

%ig) auf 6,5 bzw. 5,0 eingestellt.

Puffer B : 19,5 ml bidest. Wasser
+ 0,32 ml Salzsäure 1 N
+ 0,02 ml Essigsäure 100 %ig
+ 0,2 ml Titriplex III-Lösung 0,1 Mol
+ 0,02 ml Mercaptoäthanol

Der pH-Wert wird mit Ammoniaklösung (1 %ig) eingestellt.

Puffer C : 48,0 ml bidest. Wasser
+ 2,0 ml Pyridin
+ 0,8 ml Salzsäure 1 N

Einstellung des pH-Wertes erfolgt mit Pyridin oder Salzsäure (0,1 N).

2.11.2 Spaltansätze und Blindwerte

Die Proben werden in Reacti-vials (Pierce) gefüllt und im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Die Enzymaktivität wird gestoppt durch Erhitzen für zwei Minuten auf 100° C. Anschließend wird die Probe für fünf Minuten auf Eis gestellt und in der Vakuum-Zentrifuge (Savant) zur Trockene gebracht.

2.12 Derivatisierung und Identifizierung der Aminosäuren und Dipeptide

2.12.1 Derivatisierung mit 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB)

Nach dem Einengen in der Vakuum-Zentrifuge wird die Probe in 0,2 ml 2 %iger Natriumbicarbonatlösung ($NaHCO_3$ - Lösung) aufgenommen, 0,2 ml Dioxan und 0,2 ml Dioxan mit 2-5 mg DNFB zugesetzt. Man läßt über Nacht bei Raumtemperatur reagieren. Nach Zugabe von 1,0 ml 2 %iger $NaHCO_3$ - Lösung wird einmal mit 2 ml Äther und zweimal mit 1 ml Äther extrahiert (bzw. so lange, bis der Äther farblos ist). Anschließend wird mit zwei Tropfen 5 N HCl angesäuert und die Dinitrophenyldipep-

tide und -aminosäuren werden mit dreimal 1 ml Essigsäureäthylester und/oder mit dreimal 1 ml sekundärem Butanol extrahiert. Die Lösung wird in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockene gebracht und in wenig Methanol aufgenommen. Die vollständige Abtrennung von überschüssigem DNFB und bei der Reaktion entstandenem Dinitrophenol (DNP) wird mit DC überprüft (siehe 2.7.). Die Identifizierung der dinitrophenylierten Aminosäuren und Dipeptide mit HPLC erfolgt durch Auftrennung an einer RP 8 - Säule (4,6 mm x 250 mm) mit 5 µm Korngröße bei 60° C. Als Fließmittel wird Essigsäure pH 2,5 verwendet und Acetonitril zugemischt. Die Konzentration von Acetonitril wird dabei in 40 Minuten von 15 auf 55 % erhöht. Die Detektion erfolgt bei 360 nm. Die erhaltenen Peaks werden aufgefangen, eingeengt und durch Massenspektrometrie mit dem Direkteinlaßsystem bestimmt (Elektronenenergie 70 eV). Zusätzlich werden die underivatisierten und derivatisierten Spaltprodukte mit Dünnschichtelektrophorese nachgewiesen.

2.12.2 Derivatisierung mit Methanol / Salzsäure (MeOH / HCl) und Perfluorpropionsäureanhydrid (PFPA)

Zur gaschromatographischen Identifizierung werden die Dipeptide am Carboxylende mit MeOH / HCl verestert und am Aminoende mit PFPA perfluorpropionyliert.
Nach dem Einengen in der Vakuum-Zentrifuge werden die Proben über Kaliumhydroxid (KOH) und di-Phosphorpentoxid (P_2O_5) im Exsikkator über Nacht getrocknet. Jede Probe (in Reacti-vial) wird in ca. 200 µl MeOH / HCl gelöst und im Glycerinbad 30 Minuten beschallt. Nach fünf Stunden Stehen bei Raumtemperatur (T_R) wird zur Trockene gebracht, mit MeOH in Spitzgläser überführt und über KOH und P_2O_5 getrocknet. Anschließend gibt man zu jeder Probe 15 µl PFPA, schüttelt und läßt eine Stunde bei T_R stehen. Die Proben werden mit Stickstoff abgeblasen, in Methylenchlorid (CH_2Cl_2) gelöst und zentrifugiert (mit Stopfen).

Die Veresterung wurde in der Regel mit MeOH / HCl (3 N) für 5 Stunden durchgeführt. In manchen Fällen wurde auch mit 0,5 N HCl für 16 Stunden und mit 0,1 N HCl für 24 Stunden verestert. Die Carboxylgruppen der Seitenketten von Glu und Asp werden hierbei ebenfalls verestert. Bei der Perfluorpropionylierung werden auch die Amino- und Amidgruppen der Seitenketten von Lys, Gln, Asn, sowie die Hydroxylgruppen der Seitenketten von Ser, Thr und Tyr acyliert.
Die Identifizierung mit GC erfolgt durch Einspritzen von 1-2 µl Probe bei einer Injektortemperatur von 220° C und Auftrennung durch CP Sil 5 oder OV 1701 (25 m Säulenlänge). Trägergas ist Helium mit einem Strom von 1,8 - 2 ml / Minute. Das verwendete Programm ist zwei Minuten bei 100° C, dann wird die Temperatur um 2° C pro Minute bis 280° C erhöht. Durch GC / MS Kopplung können die PFP-Dipeptidmethylester eindeutig identifiziert werden.

2.12.3 Derivatisierung mit Isopropanol / Salzsäure (i.Prop. / HCl) und Perfluorpropionsäureanhydrid (PFPA)

Die Proben in denen Aminosäuren vermutet werden, werden bevorzugt mit i.Prop. / HCl und PFPA derivatisiert.
Die Veresterung erfolgt hier mit 200 µl i.Prop. / HCl (4 N) während 30 Minuten bei 110° C. Ansonsten ist die Derivatisierung genauso, wie sie bereits in Kapitel 2.12.2 beschrieben wurde. Die Identifizierung mit GC / MS erfolgt ebenfalls genauso wie unter 2.12.2 angegeben, nur mit einem abgeänderten Temperaturprogramm : 5 Minuten bei 60° C, anschließend wird um 5° C pro Minute erhöht.

3. ERGEBNISSE und DISKUSSION

der Enzymanreicherungen von DAP IV und der Enzymcharakteristika

3.1 Vorausgehende Anreicherungen von DAP IV

DAP IV wurde bisher aus vielen Geweben und Organen der unterschiedlichsten Spezies angereichert (siehe 1.2.2). In der vorliegenden Arbeit wurde das Enzym aus Schweinenieren isoliert, da diese jederzeit vom Schlachthof bezogen werden konnten.

Die Durchführung der DAP IV-Anreicherungen erfolgt in Anlehnung an die Methoden von Kenny et al. (33), Hopsu-Havu et al. (31) und Oya et al. (49). Schweinenieren werden mit bidest. Wasser vermengt und homogenisiert. Der beim Zentrifugieren erhaltene Rückstand wird gesammelt, in bidest. Wasser aufgeschlämmt, erneut homogenisiert und anschließend mit dem Überstand der ersten Zentrifugation vereinigt. Nach dem zweiten Zentrifugieren wird die überstehende Lösung mit Schwefelsäure auf pH 3,8 eingestellt und einer Autolyse unterworfen. Danach wird zentrifugiert und filtriert. Aus dem klaren Überstand wird das Protein fraktioniert ausgefällt (50-85 %ige Ammoniumsulfatfällung). Der erhaltene Niederschlag wird in wenig Puffer gelöst. Die Reinigung des Enzyms erfolgt durch Säulenchromatographie an verschiedenen Materialien. Durch eine Entsalzungschromatographie an Sephadex G-25 fine werden in erster Linie niedermolekulare Verbindungen, vor allem Ammoniumsulfat, abgetrennt. Bei der nachfolgenden Gelfiltration an Sephadex G-200 erfolgt Auftrennung der in der Probe enthaltenen Proteine im Molekulargewichtsbereich 5 000 bis 800 000. Die

DAP IV haltigen Fraktionen werden durch Ultrafiltration konzentriert (verwendete Membranen : UM 10, PM 30, YM 30) und durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-cellulose 52 weiter gereinigt. Die, bei der Elution erhaltenen zwei Fraktionsbereiche mit DAP IV-Aktivität werden getrennt weiter behandelt. Nach erneuter Konzentrierung der DAP IV enthaltenden Fraktionen durch Ultrafiltration wird an DEAE-cellulose 52 rechromatographiert. Die Fraktionen mit DAP IV-Aktivität werden vereinigt und durch Ultrafiltration konzentriert.
Mit dieser Enzymlösung, die aber noch kein Produkt ausreichender Reinheit darstellte, wurden Vorversuche für eine effektivere Anreicherung von DAP IV durchgeführt. Als Ziele wurden vor allem die zeitliche Verkürzung einer Aufarbeitung auf wenige Wochen (bisher mehrerere Monate) und die Gewinnung eines möglichst reinen DAP IV-Präparates, ohne, für die späteren Sequenzierungsversuche störende, Nebenaktivität angestrebt. Die Zusammenfassung einer vorausgehenden Anreicherung von DAP IV ist in Tabelle 4 gezeigt. Abb. 23 bringt eine Übersicht der wichtigsten Anreicherungschritte in einem SDS-Polyacrylamidgel.

3.2 Untersuchungen zur Anreicherung von DAP IV

Um eine effektivere Anreicherung zu erhalten, wurden mit dem weitgehend gereinigten Enzym DAP IV einige Vorversuche durchgeführt.

3.2.1 Optimale Solubilisierung und fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Die erste Frage war, wie man das membrangebundene Enzym möglichst quantitativ in Lösung bringt. Die zur Verwendung stehenden Verfahren, wie Triton-X-100 Behandlung, Ultraschallbehandlung, Gefrieren und Auftauen, Trypsinverdau, Behandlung mit Schlangengift, Autolyse u.a. ergaben, daß die

Autolyse am effektivsten ist (27). Nach Untersuchungen von Hopsu-Havu et al. (30) ist Autolyse bei pH 3,8 und 37° C das wirksamste Verfahren zur Solubilisierung von DAP IV.
Um eine optimale Ausbeute an Enzym DAP IV zu erhalten, wurde das Homogenisat verschiedene Zeiten bei pH 3,8 und 37° C inkubiert und die Enzymaktivität verfolgt. Das Ergebnis zeigt Abb. 7. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte bei allen Proben nach Zentrifugation des autolysierten Extraktes.

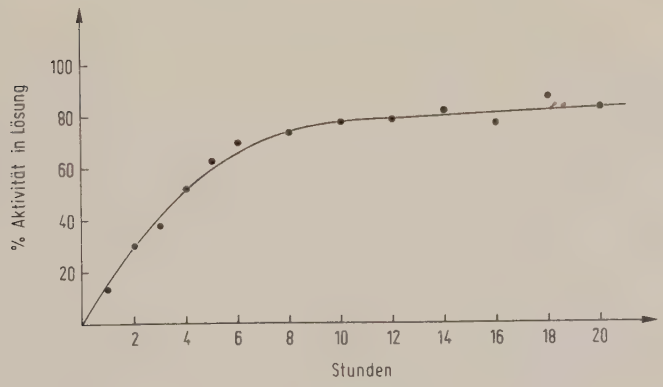


Abb. 7 Solubilisierung von DAP IV bei verschiedenen Inkubationszeiten (bei pH 3,8 und 37° C)

Die Autolyse als Funktion der Zeit ergibt, daß bei pH 3,8 und 37° C nach etwa 10 Stunden ein Maximum der Enzymsolubilisierung von 85 % erreicht wird, das ungefähr 12 Stunden anhält.
Zur groben Abtrennung des unerwünschten Proteinanteiles im Rohextrakt (= autolysierter Extrakt) wurden verschiedene fraktionierte Ammoniumsulfatfällungen durchgeführt. Nur durch die Ammoniumsulfatfällung in einem bestimmten Bereich wurden für die folgende Reinigung optimale Bedingungen erreicht. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach Dialyse der

in Puffer gelösten fraktionierten Ammoniumsulfatfällung. Bei dem 50-85 %igen Ammoniumsulfatniederschlag ist das Verhältnis von DAP IV (Units) zu Gesamtprotein (mg) am günstigsten und auch die Endausbeute (nach dem letzten Reinigungsschritt) am höchsten.

3.2.2 pH-Stabilität und pH-Abhängigkeit

Für eine effektive Aufarbeitung ist es wichtig, in welchem pH-Bereich man sich bewegen muß, um eine irreversible Denaturierung des Enzyms während der Anreicherung zu vermeiden (pH-Stabilität). Außerdem ist das pH-Optimum der Enzymaktivität von Bedeutung, da bei der Aktivitätsbestimmung, die nach jedem Anreicherungsschritt erfolgt, Enzym und Substrat gespart werden können (pH-Abhängigkeit). Es wurden gleiche Mengen weitgehend gereinigten Enzyms in jeweils gleichen Puffervolumina (0,1 Mol Tris/HCl) von verschiedenem pH-Wert über Nacht inkubiert (18 Stunden) und jeweils die Aktivität bestimmt. Wie das Ergebnis in Abb. 8 zeigt, liegt das pH-Optimum von DAP IV im Bereich von 7,8 - 9,0.
Zur Ermittlung der pH-Stabilität wurde aus jeder Probe eine aliquote Menge entnommen und in jeweils gleichen Puffervolumina (0,1 Mol Tris/HCl pH 8) inkubiert. Die Proben wurden auf gleichen pH-Wert überprüft und nach einer Stunde Inkubationszeit die Aktivität bestimmt. Abb. 8 zeigt das Ergebnis der reversiblen Denaturierbarkeit von DAP IV durch Inkubation in Puffer mit pH 8. Daraus ergibt sich, daß bei einem pH-Wert von 3,8 das Enzym DAP IV auch nach mehreren Stunden nicht irreversibel denaturiert ist. Bei diesem pH-Wert liegt es zwar fast vollständig denaturiert vor, aber selbst nach 18 Stunden Inkubation in Puffer pH 3,8 und anschließender Reinkubation in Puffer pH 8 für nur eine Stunde erfolgt wieder vollständige Renaturierung.

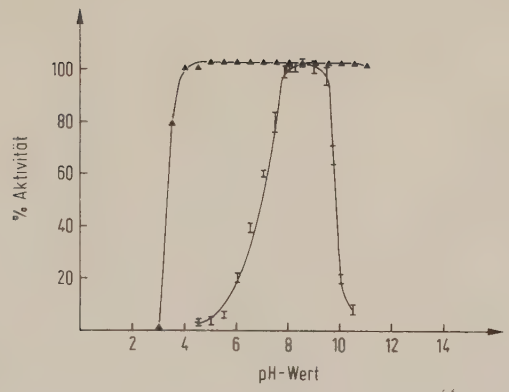
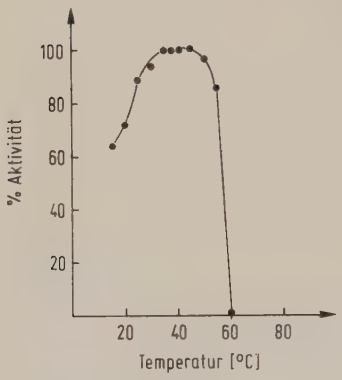


Abb. 8 pH-Stabilität und pH-Abhängigkeit von DAP IV in 0,1 Mol Tris / HCl Puffer

3.2.3 Temperatur-Abhängigkeit und -Stabilität

Auf analoge Weise wurden Temperatur-Abhängigkeit und -Stabilität des Enzyms untersucht, um zu erfahren, in welchem Temperaturbereich die Enzymanreicherung erfolgen sollte. Die Bestimmung des Temperatur-Optimums ist ebenfalls für eine empfindliche Aktivitätsbestimmung erforderlich.
Für die Bestimmung der Temperatur-Abhängigkeit wurden gleiche Mengen weitgehend gereinigten Enzyms DAP IV in jeweils gleichen Puffervolumina (0,1 Mol Tris/HCl pH 8) bei verschiedenen Temperaturen zwischen 10 und 70° C für 15 Minuten inkubiert. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mit Substratlösung bei 37° C. Abb. 9 zeigt die Auswirkungen der Temperatur auf die Hydrolyserate von Gly-pro-2-NNap durch das Enzym DAP IV.
Zur Untersuchung der Hitzestabilität von DAP IV wurden aus obigen Ansätzen (DAP IV bei verschiedenen Temperaturen

inkubiert) in bestimmten Zeitabständen Proben entnommen und Aktivitätsbestimmungen bei 37° C durchgeführt. Abb. 10 zeigt die Stabilität des Enzyms bei verschiedenen Temperaturen.



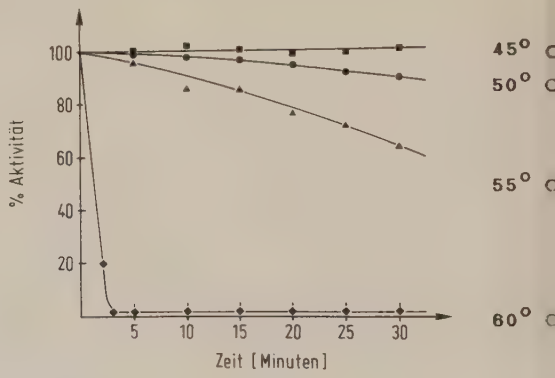


Abb. 9
Temperatur-Abhängigkeit von DAP IV (15 Minuten bei verschiedenen Temperaturen inkubiert)

Abb. 10
Temperatur-Stabilität von DAP IV (verschiedene Zeiten bei bestimmter Temperatur inkubiert)

Aus diesen, bei verschiedenen Temperaturen durchgeführten, Versuchen läßt sich ableiten, daß mit einer Hitzedenaturierung von DAP IV bei Temperaturen bis 45° C nicht gerechnet werden muß. Das Temperatur-Optimum für die Aktivitätsbestimmung liegt im Bereich von 35 - 45° C.

Aus den Ergebnissen der Voruntersuchungen folgte, daß bei der Enzymsolubilisierung durch Autolyse bei einem pH-Wert von 3,8 etwa 85 % des Enzyms in Lösung gehen und kein Abfall des Solubilisierungsmaximums im Zeitraum von 10 - 20 Stunden Autolyse erfolgt, wie von Hopsu-Havu et al. (30) angegeben. Die von Kenny et al. (33) gemachten Angaben über nur 60 %ige Enzymsolubilisierung bei den Autolysebedingungen pH 3,8 / 37° C / 18 Stunden konnten nicht bestätigt werden. Der bei

der Autolyse verwendete pH-Wert von 3,8 hat keine Verluste durch irreversible Denaturierung des Enzyms zur Folge. Bei der anschließenden Ammoniumsulfatfällung erwies sich eine Fraktionierung von 50 - 85 % als am günstigsten. Für die Bestimmung der Aktivität ergab sich ein Optimum im pH-Bereich von 7,8 - 9,0 und im gleichzeitigen Temperaturbereich von 35 - 45° C.
Bei den im folgenden beschriebenen DAP IV-Anreicherungen erfolgte die Enzymsolubilisierung daher stets durch Autolyse bei pH 3,8 und ca. 40° C für etwa 18 Stunden. Die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung wurde mit 50 bzw. 85 % Ammoniumsulfat durchgeführt. Die Aktivitätsbestimmungen wurden bei pH 8 und 37° C ausgeführt.

3.3 Schnellere und effektivere Anreicherungen von DAP IV ohne Affinitätschromatographie

Die hier beschriebenen Enzymaufarbeitungen erfolgten unter Berücksichtigung der in den Vorversuchen erzielten Ergebnisse. Außerdem wurden bei den folgenden Anreicherungsverfahren einzelne Reinigungsschritte aus der neueren Literatur entnommen und zu einer Kurzmethode zusammengefaßt : Kenny et al. (33), Hopsu-Havu et al. (31), Kojima et al. (50), Svenson et al. (71), Barth et al. (32), Krutzsch et al. (35) und Fukasawa et al. (36). Die anfangs, nach diesem Verfahren, durchgeführten Enzymanreicherungen beinhalteten die Affinitätschromatographie an Gly-pro-AH-Sepharose noch nicht, lieferten aber bereits wesentlich bessere Ergebnisse, als die vorherigen Versuche (wie unter 3.2 beschrieben). Eine vollständige Abtrennung der Aminopeptidase-Aktivität gelang hierbei jedoch nicht. Da die hier verwendeten Methoden mit denen im folgenden Kapitel identisch sind, außer, daß noch eine Affinitätschromatographie neu mit eingebaut wurde, sind die Ergebnisse nur in einer Tabelle (Tabelle 5) dargestellt. Eine Übersicht über die wichtigsten Anreicherungsschritte zeigt Abb. 24.

3.4 Enzymanreicherung von DAP IV mit Affinitätschromatographie an Gly-pro-AH-Sepharose

Die Anreicherungsform, die letztlich ein DAP IV-Präparat frei von Aminopeptidase-Aktivität ergab, ist im folgenden ausführlich beschrieben. Zum Überblick ist in Abb. 11 ein Schema mit den durchgeführten Anreicherungsschritten angegeben.

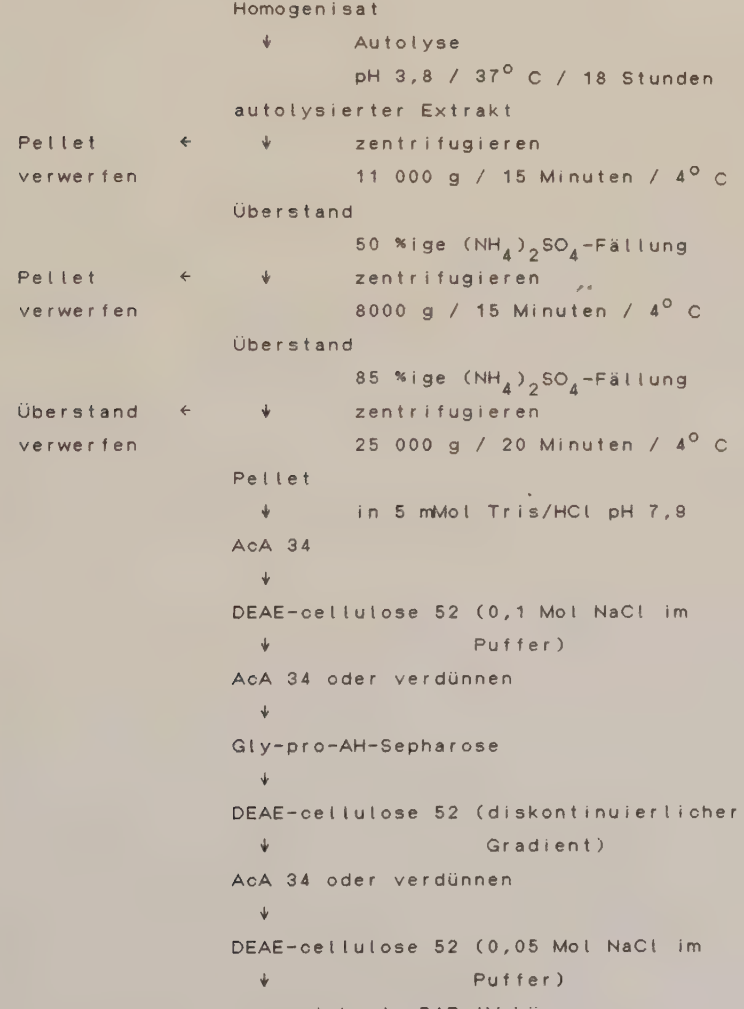
3.4.1 Solubilisierung und fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (Tabelle 6 / Nr 1 - 7)

Zu Beginn der Anreicherung werden 2 kg Schweinenieren zerkleinert, mit 2000 ml bidest. Wasser versetzt und ca. zwei Minuten homogenisiert (Ultra Turrax). Während des Homogenisierens, sobald die Nierenstücke gut zerkleinert sind, werden nach und nach weitere 3000 ml bidest. Wasser zugegeben. Anschließend wird mit 6,3 N Schwefelsäure auf pH 3,8 eingestellt und bei 37° C für ca. 18 Stunden autolysiert. Danach wird zentrifugiert (11 000 g / 4° C / 15 Minuten), filtriert und aus dem klaren Überstand das Protein fraktioniert ausgefällt :

a) 50 %ige Ammoniumsulfatfällung

Dem autolysierten Extrakt wird fein zermahlenes Ammoniumsulfat in kleinen Portionen langsam unter Rühren zugegeben, bis die Lösung 50 %ig an Ammoniumsulfat ist (298 g / Ltr.). Man rührt über Nacht bei 4° C, zentrifugiert vom Niederschlag ab (8000 g / 4° C / 20 Minuten) und filtriert.

Abb. 11 Überblick über die einzelnen Reinigungsschritte der Anreicherung von DAP IV mit vollständiger Abtrennung der Aminopeptidase-Aktivität an Gly-pro-AH-Sepharose



b) 85 %ige Ammoniumsulfatfällung

Dem von a) erhaltenen Überstand wird erneut Ammoniumsulfat zugegeben bis zur 85 %igen Sättigung (246 g / Ltr.) und, nach dem Rühren über Nacht bei 4° C, zentrifugiert (25 000 g / 4° C / 20 Minuten).
Bei der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung erfolgt eine grobe Auftrennung des gesammten Proteins in der Probe. Dabei werden alle Eiweißverbindungen, die im Bereich einer 50 - 85 %igen Lösung ausgefällt werden, zusammen durch Zentrifugation abgetrennt. Der so erhaltene Niederschlag (50 - 85 %ige Ammoniumsulfatfällung) wird in möglichst wenig Puffer (5 mMol Tris/HCl pH 7,9) gelöst. Die Reinigung der Enzymlösung erfolgt durch Säulenchromatographie, alle folgenden Schritte werden bei Raumtemperatur ausgeführt.

3.4.2 Gelfiltration an AcA 34 (Polyacrylamid-Agarose-Gel) (Tabelle 6 / Nr 8)

Bei der Gelfiltration an AcA 34 werden die in der Probe enthaltenen Verbindungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, unter gleichzeitiger Abtrennung der niedermolekularen Verbindungen.
Das Säulenmaterial wird mit 5 mMol Tris/HCl pH 7,9 äquilibriert. Die pro Säule (2,5 x 100 cm) aufgegebene Probemenge (50 - 85 %ige Ammoniumsulfatfällung in Puffer) beträgt 30 - 50 ml. Elutionspuffer ist 5 mMol Tris/HCl pH 7,9. Der Durchfluß beträgt 6 ml / 30 Minuten (das entspricht einer Fraktion). Abb. 12 zeigt die Extinktionen bei 280 nm und die gemessene Aktivität an DAP IV in den einzelnen Fraktionen. Die DAP IV haltigen Fraktionen (25 - 45) werden vereinigt. Abb. 13 und 14 zeigen die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen von jeder vierten Fraktion mit Protein bzw. von jeder zweiten DAP IV haltigen Fraktion.

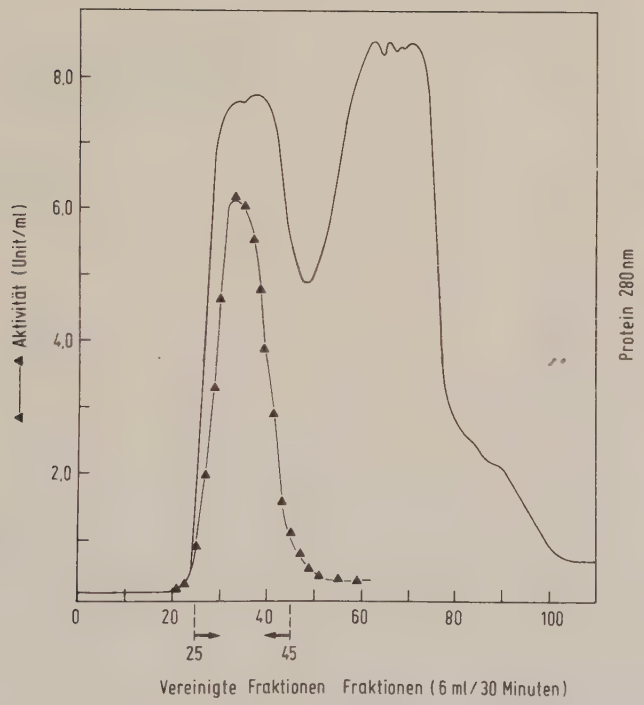


Abb. 12 Gelfiltration an AcA 34

Durch Gelfiltration an AcA 34 statt an Sephadex G - 25 fine und Sephadex G - 200 ist diese Vortrennung wesentlich zeitsparender und auch wirksamer geworden, da sie in einem kleineren Molekulargewichtsbereich erfolgt (MG 20 000 - 350 000, statt vorher MG 5 000 - 800 000). Hierbei werden gleichzeitig die niedermolekularen Verbindungen abgetrennt.

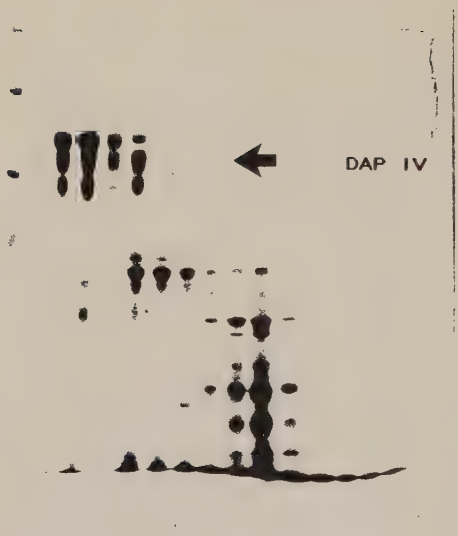


Abb. 13
SDS-Polyacrylamid-Plattengel von AcA 34, jede vierte Fraktion (25 - 81) mit Protein

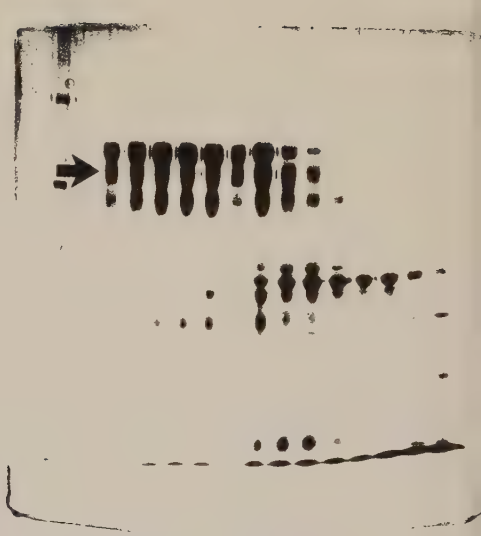


Abb. 14
SDS-Polyacrylamid-Plattengel von AcA 34, jede zweite Fraktion (25 - 53) mit Protein

3.4.3 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-cellulose 52 (Tabelle 6 / Nr 9)

Zur weiteren Reinigung des Enzyms wird die Probe über DEAE-cellulose chromatographiert. Da das Enzym DAP IV einen isoelektrischen Punkt < 7 hat, ist es nach außen negativ geladen und kann somit an einen Anionenaustauscher gebunden werden. Durch Waschen mit Puffer und anschließende Elution mit NaCl-haltigem Puffer erfolgt weitere Abtrennung von unerwünschtem Protein.
Das Säulenmaterial wird mit 5 mMol Tris/HCl pH 7,9 äquilibriert. Auf die Säule (5,5 x 20 cm) wird die ganze unkonzentrierte Probe (gesamte vereinigte Fraktionen (25 - 45) aller Gelfiltrationen) aufgetragen und zuerst mit 5 mMol

Tris/HCl pH 7,9 gewaschen, dann mit 0,1 Mol NaCl in 5 mMol Tris/HCl pH 7,9 eluiert. Der Durchfluß beträgt 8 ml in 10 Minuten (das entspricht einer Fraktion). Aus Abb. 15 sind die Extinktionen bei 280 nm sowie die gemessene Aktivität an DAP IV der einzelnen Fraktionen ersichtlich. Abb. 16 zeigt eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von jeder fünften Fraktion mit Protein bzw. DAP IV. Die DAP IV enthaltenden Fraktionen (69 - 81) werden vereinigt.

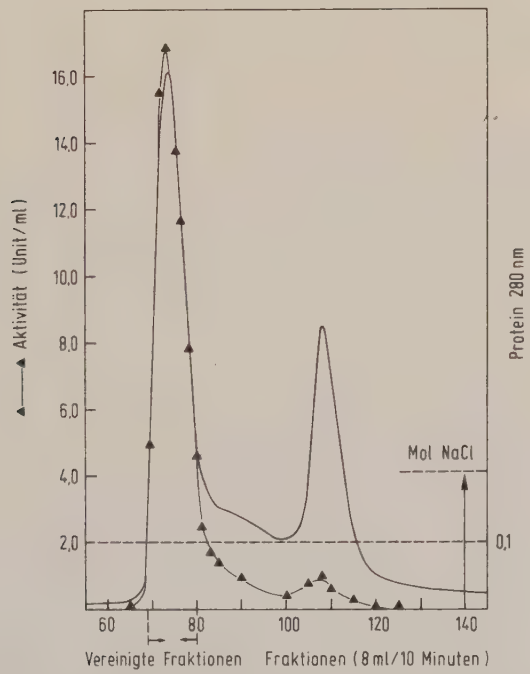


Abb. 15 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-cellulose 52

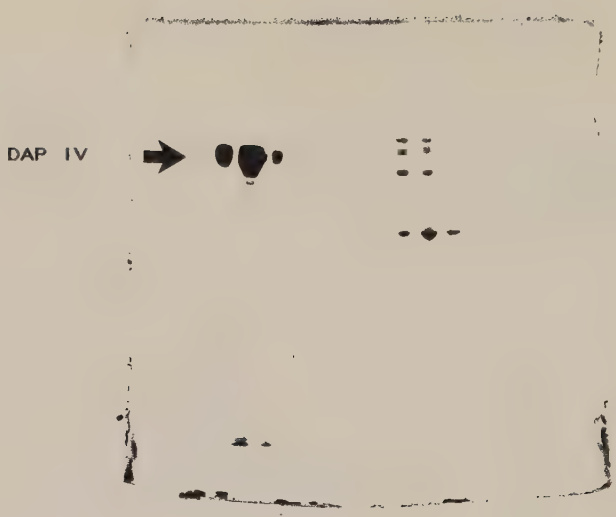


Abb. 16 SDS-Polyacrylamid-Plattengel von DEAE-cellulose 52, jede fünfte Fraktion (65 - 125) mit Protein bzw. DAP IV

Im Gegensatz zu den früheren Anreicherungen wurde zur Elution des Enzyms in diesem Schritt ein diskontinuierlicher NaCl-Gradient mit nur einer Stufe verwendet, statt einem kontinuierlichen NaCl-Gradienten. Der Proteinanteil der Probe ist dadurch für die später durchgeführte Affinitätschromatographie noch ausreichend hoch, um eine wirksame Trennung zu erhalten. Die früher durchgeführten Anreicherungen ergaben bei diesem Reinigungsschritt zwei Bereiche mit DAP IV-Aktivität, was vermutlich durch beginnende Proteolyse bei den Chromatographien an Sephadex G - 25 fine, G - 200 und DEAE-cellulose verursacht wurde, die einen wesentlich höheren Zeitaufwand erforderten. Dieses Phänomen trat hier nicht mehr auf.
Um die DEAE-cellulose nach diesem Schritt wiederverwenden zu können, war eine Regeneration des Säulenmaterials notwendig.

Dazu wurde das Material in der Säule mit ca. 2 Säulenvolumen 0,5 Mol NaCl in 5 mMol Tris/HCl pH 9,0 und mit ca. 4 Säulenvolumen 5 mMol Tris/HCl pH 7,9 gewaschen. Anschließend wurde im sauren mit ca. 2 Säulenvolumen 0,5 Mol NaCl in 5mMol Tris/HCl pH 5,0 und erneut mit etwa 4 Säulenvolumen 5 mMol Tris/HCl pH 7,9 gewaschen. Nach dem Entleeren der Säule wurde mit konzentriertem Puffer (0,5 M Tris/HCl pH 7,9) der pH-Wert neu eingestellt, die Säule wieder gefüllt und mit Äquilibrierungspuffer etwa zwei Tage gespült.

3.4.4 Gelfiltration an AcA 34 oder Verdünnen der vereinigten Fraktionen mit Aktivität mit der vierfachen Menge bidest. Wasser (Tabelle 6 / Nr 10)

Durch Gelfiltration an AcA 34 oder Verdünnen der vereinigten Fraktionen (69 - 81) aus 3.4.3 wird die, für die nächste Säulenchromatographie störende, hohe Kochsalzkonzentration entfernt oder stark vermindert.
Die Gelfiltration wird wie unter 3.4.2 beschrieben durchgeführt. Die pro Säule aufgetragene Probemenge (alle vereinigten Fraktionen aus der vorhergehenden Ionenaustauschchromatographie) beträgt ca. 50 ml.
Abb. 17 zeigt die Extinktionen bei 280 nm. Es werden alle proteinhaltigen Fraktionen vereinigt, da hier kein Anreicherungsschritt erfolgt, sondern nur Abtrennung des Kochsalzes. Aus diesem Grund wird auch die DAP IV-Aktivität der einzelnen Fraktionen nicht bestimmt.
Die in früheren Anreicherungen durchgeführten Praktiken wie : Ultrafiltration, Dialyse und Einhängen von mit Probe gefüllten Dialyseschläuchen in fein gepulverte Saccharose zur Abtrennung von Salzen bzw. zur Konzentrierung der Probe bewirkten, besonders in den schon relativ hoch angereicherten Enzymlösungen, große Aktivitätsverluste durch Absorption an die Membran und führten zu niedrigen Ausbeuten. Sie wurden daher nicht mehr verwendet. Von der Probenverdünnung zur Verminderung der Kochsalzkonzentration wurde ebenfalls in einigen Fällen abgesehen, wenn das Probevolumen für die

jeweils anschließenden Reinigungsschritte zu groß geworden wäre.

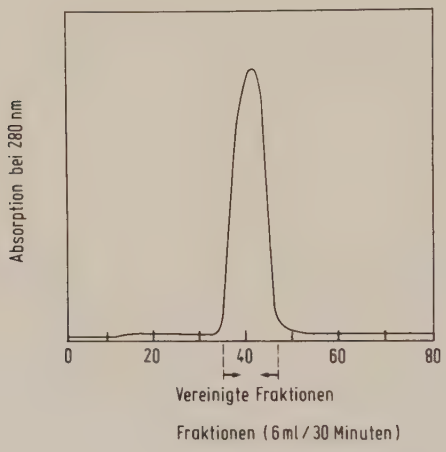


Abb. 17 Gelfiltration an AcA 34

3.4.5 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist ein sehr bedeutendes Trennverfahren der heutigen Zeit. Durch kovalente Anknüpfung einer Verbindung (z.B. Enzymsubstrat oder Antikörper) und anschließende Chromatographie der DAP IV haltigen Probe ist eine vollständige Abtrennung der Aminopeptidase möglich. Durch Chromatographie bei einem bestimmten pH-Wert wird DAP IV spezifisch an Gly-pro-AH-Sepharose gebunden und durch einen Kochsalzgradienten wieder eluiert. Die Verunreinigungen haben entweder keine Affinität zu diesem Säulenmaterial, dann werden sie nicht gebunden, oder sie haben eine andere Affinität als DAP IV, dann werden sie durch den NaCl-Gradienten vor oder nach dem DAP IV eluiert.

3.4.5.1 Herstellung von Glycyl-prolyl-Aminohexyl-Sepharose 4B (Gly-pro-AH-Sepharose)

Die Herstellung der Gly-pro-AH-Sepharose erfolgt entsprechend den Angaben in der Literatur (61-63, 123). Es werden 3 g AH-Sepharose 4 B in 30 ml 0,5 Mol NaCl aufgeschlämmt, danach läßt man über Nacht bei Raumtemperatur quellen. Die Suspension wird in eine schmale Säule gefüllt, mit ca. 600 ml 0,5 Mol NaCl und anschließend mit bidest. Wasser gewaschen. Wenn im Eluat kein Chlorid mehr nachweisbar ist, wird das Säulenmaterial in einen Erlenmeyerkolben entleert und mit einer Lösung von 60 mg Gly-Pro in wenig bidest. Wasser gemischt. Anschließend wird festes Carbodiimid zugegeben (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid), bis zu einer Endkonzentration von 0,1 Mol. (Gesamtvolumen der Probe ca. 25 ml.) Der pH-Wert wird mit verdünnter Essigsäure auf 4,7 eingestellt und man läßt 24 Stunden bei Raumtemperatur reagieren, unter leichtem Schwenken. Die Suspension wird in eine schmale Säule (1 x 25 cm) gefüllt und mit 0,5 Mol NaCl und bidest. Wasser gewaschen. Vor der Verwendung zur Enzymreinigung wird das Säulenmaterial mit 5 mMol Tris/HCl pH 6,0 äquilibriert.

3.4.5.2 Affinitätschromatographie an Gly-pro-AH-Sepharose (Tabelle 8 / Nr 11)

Nach der Ionenaustauschchromatographie an DEAE-cellulose 52 und der Gelfiltration an AcA 34 wird die ganze, unkonzentrierte Probe (vereinigte Fraktionen aller Gelfiltrationen mit DAP IV-Aktivität) auf eine Gly-pro-AH-Sepharose-Säule (1 x 14,5 cm) aufgetragen, die mit 5 mMol Tris/HCl pH 6,0 äquilibriert worden war. Das Säulenmaterial wird anschließend mit 5 mMol Tris/HCl pH 6,0 gewaschen und mit einem Kochsalzgradienten (0,0 - 0,2 Mol NaCl) im gleichen Puffer werden die Proteine wieder eluiert. Der Durchfluß beträgt 5,5 ml in 30 Minuten (das entspricht einer Fraktion). Aus Abb. 18 sind die Extinktionen bei 280 nm,

sowie die gemessene Aktivität an DAP IV und Aminopeptidase (mit Leu-2-NNap als Substrat) der einzelnen Fraktionen zu ersehen. Abb. 19 zeigt eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von jeder fünften Fraktion mit DAP IV bzw. Protein. Die DAP IV haltigen und gleichzeitig Aminopeptidase freien Fraktionen (37 - 74) werden vereinigt und wie unter 3.4.6 beschrieben weiter verwendet.

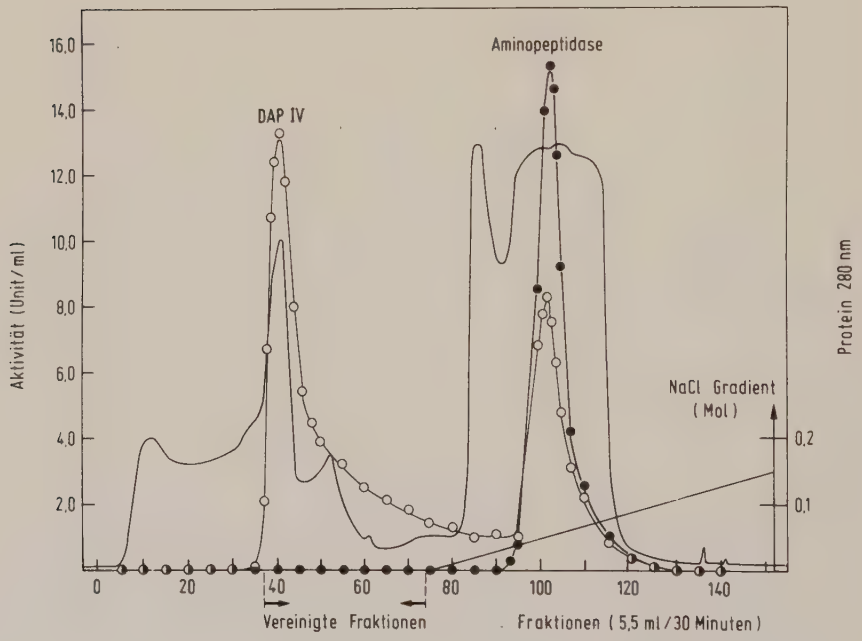


Abb. 18 Affinitätschromatographie an Gly-pro-AH-Sepharose

Das erreichte Ergebnis ist folgendermaßen zu verstehen : Nach dem Auftragen der Probe werden zunächst alle Bindungsstellen der AH-Sepharose von Aminopeptidase und DAP IV besetzt. Ab einem bestimmten Zeitpunkt, wenn alle diese Stellen besetzt sind (Fraktion 35 in Abb. 18), wird das

Abb. 19 SDS-Polyacrylamid-Plattengel von Gly-pro-AH-Sepharose, jede fünfte Fraktion (10 - 80) mit DAP IV bzw. Protein

Enzym DAP IV ohne Aminopeptidase eluiert. Daraus kann geschlossen werden, daß die Aminopeptidase eine starkere Affinität zum Säulenmaterial besitzt und DAP IV von den bereits besetzten Bindungsstellen verdrängt. Im Säulenmaterial sind für die vollständige Bindung von Aminopeptidase ausreichend Bindungsstellen vorhanden, deshalb wird auch beim Waschen der Säule mit Puffer (5 mMol Tris/HCl pH 8,0) nur DAP IV und sonstiges Protein, aber keine Aminopeptidase, eluiert. Dadurch, daß noch Probenaufgabe erfolgt, während schon DAP IV eluiert wird, erfolgt keine vollständige Abtrennung des Proteins, das keine Affinität zu Gly-pro-AH-Sepharose besitzt. Mit anderen Worten : In diesem beschriebenen Fall überschneiden sich Probenaufgabe und Elution von DAP IV, wodurch keine vollstandige Trennung erfolgt. Beim Waschen des Säulenmaterials mit Puffer (wie oben bereits erwähnt) wird weiterhin DAP IV eluiert, das von

der Aminopeptidase von den Bindungsstellen verdrängt worden ist. Mit einem anschließenden NaCl-Gradienten von 0,0 - 0,2 Mol NaCl (linear) in 5 mMol Tris/HCl pH 6,0 (560 ml insgesamt) werden DAP IV und Aminopeptidase gleichzeitig eluiert. Dabei ist deutlich zu sehen, daß die Affinität der beiden Enzyme zu Gly-pro-AH-Sepharose so ähnlich ist, daß eine Trennung durch einen Salzgradienten alleine nicht möglich ist. Dies bestätigten auch die zahlreichen Vorversuche mit sehr flachen und diskontinuierlichen NaCl-Gradienten. Die von Fukasawa et al. (36) und Kojima et al. (50) gegebenen Beschreibungen zur Trennung von DAP IV und Aminopeptidase durch Affinitätschromatographie an Gly-pro-AH-Sepharose mittels eines NaCl-Gradienten führten somit nach eigenen Versuchen nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Vor allem scheiterte die Abtrennung der Aminopeptidase-Aktivität aus einem schon weitgehend gereinigten DAP IV-Präparat. Aus eigenen Versuchen ergab sich, daß bei einem hohen Verhältnis von DAP IV zu Aminopeptidase eine vollständige Abtrennung der Aminopeptidase von DAP IV mit dieser Methode praktisch nicht möglich ist.

An dieser Stelle der Anreicherung gelang somit die vollständige Abtrennung der Aminopeptidase-Aktivität. Voraussetzung dafür ist eine ausreichend große Kapazität der Gly-pro-AH-Sepharose-Säule. Da die Enzymgehalte in biologischen Materialien stets natürlichen Schwankungen unterliegen, ist es ratsam, Verluste an DAP IV zugunsten einer vollständigen Abtrennung der Aminopeptidase-Aktivität hinzunehmen. Aus diesem Grund wurden auch nur die Fraktionen 37 - 74 weiterverwendet. Durch Rechromatographie des zweiten Peaks (Abb. 18) an einer kleineren Gly-pro-AH-Sepharose-Säule könnte die Ausbeute an DAP IV gesteigert werden. Die vollständige Abtrennung der Aminopeptidase-Aktivität wird durch später beschriebene Nachweismethoden belegt (3.6.1). Es sei hier lediglich darauf hingewiesen, daß selbst bei extrem langen Spaltversuchen von Dipeptiden mit DAP IV und empfindlichsten Nachweismethoden (GC / MS) keine Amino-

peptidase-Aktivität mehr nachgewiesen werden konnte (3.6.1.3).
Da bei den vorausgehenden Reinigungsschritten dieser Anreicherungsmethode die DAP IV-Aktivität und die Aminopeptidase-Aktivität immer gleichzeitig eluiert wurden, wurde an diesen Stellen nur auf DAP IV-Aktivität geprüft und erst bei der erfolgreichen Trennung der beiden Enzyme durch Affinitätschromatographie auf beide Aktivitäten geprüft.

3.4.6 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-cellulose 52 (Tabelle 6 / Nr 12)

Die Enzymlösung ist durch den vorausgegangenen Reinigungsschritt an Gly-pro-AH-Sepharose jetzt zwar frei an Aminopeptidase, enthält aber noch andere Verunreinigungen in Form von Proteinen, die ebenfalls möglichst quantitativ abgetrennt werden sollen. Diese weitere Reinigung erfolgt durch Rechromatographie an DEAE-cellulose. Dazu wird das Säulenmaterial mit 5 mMol Tris/HCl pH 7,9 äquilibriert. Auf die Säule (2,5 x 15 cm) wird die ganze unkonzentrierte Probe (alle vereinigten DAP IV haltigen und gleichzeitig an Aminopeptidase freien Fraktionen aus der Affinitätschromatographie) aufgetragen und mit einem diskontinuierlichen Gradienten von 0,00 - 0,05 Mol NaCl in 5 mMol Tris/HCl pH 7,9 eluiert. Die NaCl-Konzentration nimmt dabei pro Stufe um 5 mMol zu. Es wird jeweils so lange eluiert, bis die Extinktionen der Fraktionen wieder auf den Ausgangswert zurückgegangen sind, erst dann beginnt die nächste Stufe. Der Durchfluß beträgt 6 ml in 10 Minuten (das entspricht einer Fraktion). Aus Abb. 20 sind die Extinktionen bei 280 nm, sowie die gemessene Aktivität an DAP IV der einzelnen Fraktionen zu ersehen. Abb. 21 zeigt eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von jeder dritten Fraktion mit Protein bzw. DAP IV. Zur weiteren Reinigung wurden die Fraktionen 120-144 vereinigt.

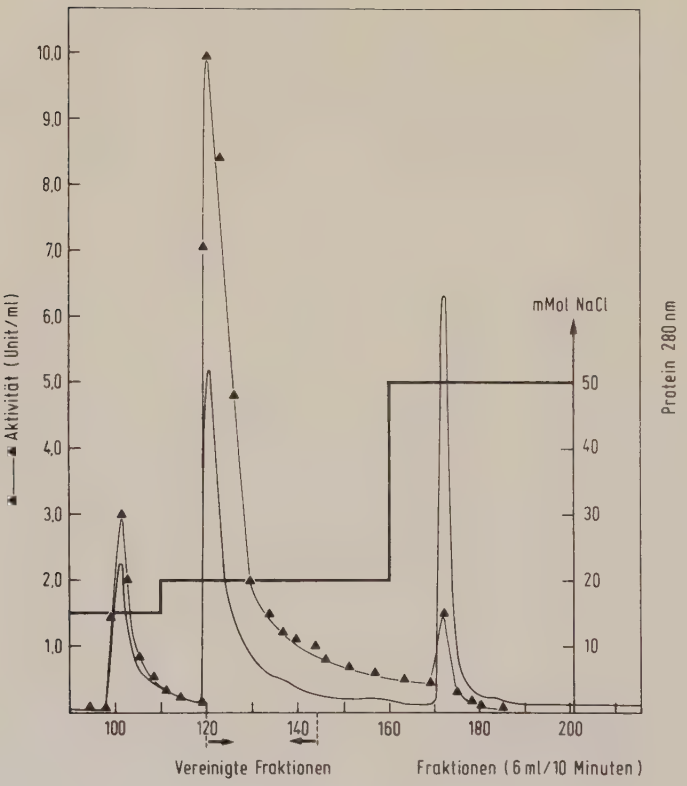


Abb. 20 Chromatographie an DEAE-cellulose 52

Durch Verwendung eines diskontinuierlichen NaCl-Gradienten war es möglich, auch kurz vor und kurz nach dem DAP IV eluierendes Protein noch gut abzutrennen.
Das Regenerieren der DEAE-cellulose erfolgt wie bereits unter 3.4.3 beschrieben.

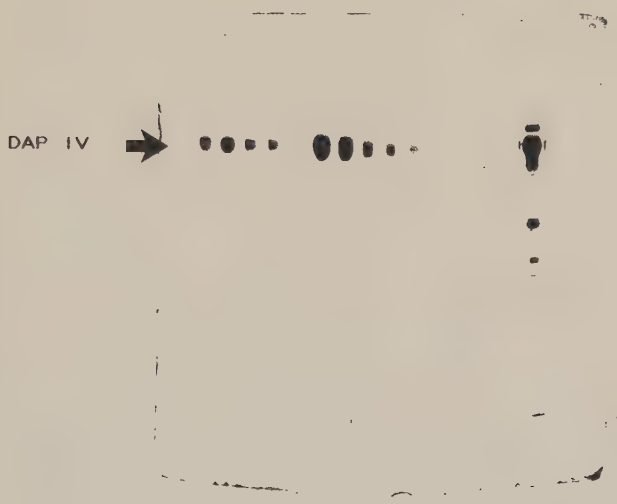


Abb. 21 SDS-Polyacrylamid-Plattengel von DEAE-cellulose 52, jede dritte Fraktion (99 - 108 / 120 - 138 / 172 - 178) mit Protein bzw. DAP IV

3.4.7 Gelfiltration an AcA 34 oder Verdünnen der vereinigten Fraktionen mit Aktivität mit der zweifachen Menge bidest. Wasser (Tabelle 6 / Nr 13)

Wie bereits unter 3.4.4 beschrieben, muß nach der Ionenaustauschchromatographie eine Abtrennung oder Verminderung des Kochsalzgehaltes erfolgen, damit es bei den folgenden Schritten zu keinen Störungen kommt (z.B. bindet das Protein dann nicht oder nur teilweise an den Ionenaustauscher). Die Durchführung ist identisch mit der in Kapitel 3.4.4 angegebenen Methode und liefert das gleiche Ergebnis.

3.4.8 Konzentrierung an DEAE-cellulose 52 (Tabelle 6 / Nr 14)

Zum Schluß der Anreicherung erfolgt Konzentrierung der DAP IV-Lösung durch Chromatographie an DEAE-cellulose. Durch eine konzentrierte Enzymlösung kann bei der späteren Peptidsequenzierung das Volumen eines Spaltansatzes klein gehalten werden, was zur Steigerung der Empfindlichkeit beiträgt.
Die dazu benutzte Säule (0,5 x 6 cm) wurde aus einer Pasteurpipette hergestellt und nur einmal verwendet. Das Säulenmaterial wird mit 5 mMol Tris/HCl pH 7,9 äquilibriert. Auf die Säule (0,5 x 6 cm) wird die ganze Probe (alle vereinigten Fraktionen aus der Gelfiltration an AcA 34) aufgetragen und nach dem Waschen mit 5 mMol Tris/HCl pH 7,9 mit 0,05 Mol NaCl in 5 mMol Tris/HCl pH 7,9 eluiert. Der Durchfluß beträgt ca. 6 ml in 10 Minuten (das entspricht einer Fraktion). Abb. 22 zeigt die Extinktionen bei 280 nm, sowie die gemessene Aktivität an DAP IV der einzelnen Fraktionen.

Die so angereicherte DAP IV-Lösung ist frei von Peptiden und Proteinen (vor allem frei an Aminopeptidase), die die Sequenzierung von Peptiden stören und nach dem Konzentrierungsschritt bei 4° C für mehrere Monate ohne Aktivitätsverlust haltbar.
Das Enzym DAP IV erwies sich bei den bei Raumtemperatur durchgeführten Anreicherungen als stabil. Anzeichen von Inaktivierung waren während der Isolierung nicht erkennbar.

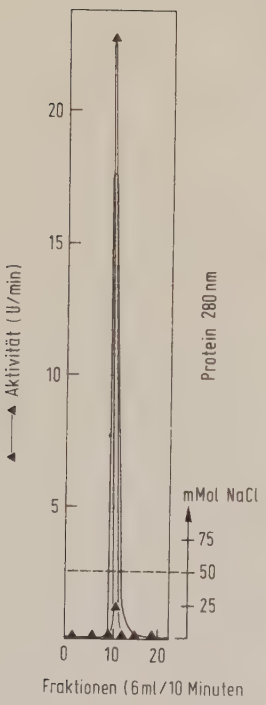


Abb. 22 Konzentrierung an DEAE-cellulose 52

Den deutlichen Fortschritt in den einzelnen Anreicherungsmethoden zeigen die folgenden drei Tabellen (Tabelle 4, 5 und 6), die die Ergebnisse jeweils einer Anreicherung zusammenfassen.

Eine erste Auswirkung der neuen Methode ist durch Vergleich der Nummern 1 bis 3 aus den drei Tabellen zu sehen : Durch Weglassen der Zentrifugation vor der Autolyse konnte die Ausbeute an DAP IV gegenüber früheren Anreicherungen um mehr als das Doppelte erhöht werden. Die Zunahme der Gesamtaktivität an DAP IV nach der 50 %igen Ammoniumsulfatfallung läßt auf einen, in dieser Fraktion abgetrennten, Inhibitor

schließen, der aber noch nicht isoliert worden ist. Morita et al. (85) und Hopsu-Havu et al. (30) haben die inhibierende Wirkung der Fraktion mit der 50 %igen Ammoniumsulfatfällung auf DAP IV nachgewiesen. Die Gelchromatographie an AcA 34, statt an Sephadex G-25 fine und G-200, brachte neben der großen Zeitersparnis ebenfalls eine Verbesserung der Anreicherung, da die Trennung in einem engeren Molekulargewichtsbereich erfolgte. Am bedeutungsvollsten in zweierlei Hinsicht für die neu ausgearbeitete Methode der DAP IV-Anreicherung war die Verwendung der Affinitätschromatographie an Gly-pro-AH-Sepharose : Zum einen gelang die vollständige Abtrennung der Aminopeptidase-Aktivität und zum anderen war dies der ausschlaggebende Reinigungschritt für eine wesentliche Erhöhung der spezifischen Aktivitat auf 24,9 Unit / mg Protein. Gegenüber den früheren Anreicherungen (5,2 Unit / mg Protein) und auch den in der Literatur beschriebenen Anreicherungen (33, 35) ohne Affinitätschromatographie mit einer spezifischen Aktivität von bis zu etwa 12 Unit / mg Protein stellte dieses Ergebnis eine wesentliche Verbesserung dar. Durch Rechromatographie an Gly-pro-AH-Sepharose (wie von Imai et al. (44) beschrieben) wäre sogar noch eine weitere Steigerung der spezifischen Aktivität möglich. In den Wiederfindungsraten unterschieden sich die drei durchgeführten Anreicherungsarten kaum, die Hauptziele lagen aber auch in einer anderen Richtung, nämlich der vollständigen Abtrennung der Aminopeptidase-Aktivität und einer möglichst hohen spezifischen Aktivität.
Einen Vergleich der ersten und zweiten Anreicherungsmethode erlauben die Abb. (23 und 24). In ihnen sind die wichtigsten Reinigungsschritte auf einem Polyacrylamidgel gezeigt.

Tabelle 4 Ergebnis einer vorausgehenden Anreicherung von DAP IV

aktion	Nr	Volumen (ml)	Protein (Biuret) (mg)	Protein (Lowry) (mg)	Unit (U) (total)	Wieder-findung (%)	(U/ml Lösung)	Aktivität (Biuret) (U/mg Protein)	Aktivität (Lowry) (U/mg Protein)	Reinigung (Biuret) (x-fach)	Reinigung (Lowry) (x-fach)
mogenisat	1	5 685	216 030	183 057	1 522	100	0.26	0.008	0.008	1	1
500 g Uberstand	2	4 718	194 388	126 447	1 392	91	0,30	0,008	0,012	1	1
tolysierter Extrakt	3	4 718	88 702	86 342	704	46	0,14	0,008	0,008	1	1
000 g Uberstand	4	4 003	4 843	40 427	676	44	0,16	0,140	0,016	17	2
ch 50 % $(NH_4)_2SO_4$	5	4 583	3 300	5 133	686	45	0,14	0,208	0,134	26	16
000 g Überstand	6	4 525	2 760	3 511	626	41	0,14	0,226	0,178	28	22
ch 85 % $(NH_4)_2SO_4$	7	5 124	2 177	2 807	602	40	0,12	0,276	0,214	34	27
000 g Nd in Puffer	8	39	1 833	2 649	620	41	15,90	0,338	0,234	42	29
ch Sephadex G-25 f.	9	259	1 433	2 375	582	38	2,24	0,406	0,246	51	31
ch Sephadex G-200	10	837	1 341	2 009	558	37	0,66	0,416	0,278	52	35
ch Ultrafiltration	11	71	1 231	1 761	444	29	6,26	0,360	0,252	45	31
ch DEAE-cellulose 52	12	656	1 149	1 169	334	22	0,50	0,290	0,286	36	36
ch Ultrafiltration	13	45	361	778	236	16	5,24	0,654	0,304	82	38
ch DEAE-cellulose 52	14	47	338	607	136	9	2,90	0,402	0,224	50	28
ch Ultrafiltration	15	17	322	580	130	9	7,64	0,404	0,224	50	28

u Nr 5 : nach 50 %iger Ammoniumsulfatfällung
u Nr 7 : nach 85 %iger Ammoniumsulfatfällung
u Nr 9 : Niederschlag der 25 000 g Zentrifugation in 10 mMol Tris / HCl pH 7,2 gelöst
u Nr 10 : Gelfiltration
u Nr 12 : Ionenaustauschchromatographie
a) ohne Gradient (nicht in die Tabelle eingegangen)
b) mit Gradient 0,0 - 0,3 Mol NaCl (weiter gereinigt, in die Tabelle eingegangen und für SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese verwendet)
u Nr 14 : Ionenaustauschchromatographie
Saule a : Probe von Nr 12 a) nur der Vollständigkeit wegen weiter gereinigt, keine Bedeutung für Anreicherung !
Säule b : Probe von Nr 12 b) weiter gereinigt mit Gradient 0,0 - 0,1 Mol NaCl (in die Tabelle eingegangen und für SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese verwendet

Tabelle 5 Ergebnis einer Anreicherung von DAP IV ohne Affinitätschromatographie

Fraktion	Nr	Volumen (ml)	Protein (Lowry) (mg)	Unit (U) (total)	Wieder-findung (%)	Aktivität (U/ml (Lösung)	Aktivität (Lowry) (U/mg Protein)	Reinigung (Lowry) (x-fach)
Homogenisat	1	7 300	274 663	2 076	100	0,3	0,008	1
autolysierter Extrakt	2	6 600	178 695	1 280	62	0,2	0,008	1
11 000 g Überstand	3	5 040	62 748	988	48	0,2	0,016	2
nach 50 % $(NH_4)_2SO_4$	4	5 740	12 987	2 440	118	0,4	0,188	24
8 000 g Überstand	5	5 360	5 017	2 342	113	0,4	0,466	58
nach 85 % $(NH_4)_2SO_4$	6	6 080	3 843	2 218	107	0,4	0,578	72
25 000 g Nd in Puffer	7	100	3 795	2 182	105	21,8	0,575	72
nach AcA 34	8	260	1 187	2 160	104	8,3	1,820	228
nach DEAE-cellulose 52	9	176	681	2 074	100	11,8	3,046	381
nach AcA 34	10	369	576	1 594	77	4,3	2,768	346
nach DEAE-cellulose 52	11	133	142	928	44	7,0	6,535	817
nach AcA 34	12	124	76	478	23	3,9	6,289	786
nach DEAE-cellulose 52	13	6	52	270	13	44,8	5,192	649

zu Nr 4 : nach 50 %iger Ammoniumsulfatfällung
zu Nr 6 : nach 85 %iger Ammoniumsulfatfällung
zu Nr 7 : Niederschlag der 25 000 g Zentrifugation in 5 mMol Tris/HCl gelöst
zu Nr 8 : Gelfiltration
zu Nr 9 : Ionenaustauschchromatographie (mit 0,1 Mol NaCl im Puffer)
zu Nr 10 : Gelfiltration
zu Nr 11 : Ionenaustauschchromatographie (diskontinuierlicher NaCl-Gradient 0,00 - 0,05 Mol)
zu Nr 12 : Gelfiltration
zu Nr 13 : Ionenaustauschchromatographie (Konzentrierung mit 0,05 Mol NaCl im Puffer)

Tabelle 6 Ergebnis einer Anreicherung mit Affinitätschromatographie an Gly-pro-AH-Sepharose (zur Abtrennung der Aminopeptidase-Aktivität)

raktion	Nr	Volumen (ml)	Protein (Lowry) (mg)	Unit (U) (total)	Wieder-findung (%)	Aktivität (U/ml Lösung)	Aktivität (Lowry) (U/mg Protein)	Reinigung (Lowry) (x-fach)
omogenisat	1	7 000	308 560	2 111	100	0,3	0,007	1
utolysierter Extrakt	2	6 600	202 950	1 925	91	0,3	0,009	1
1 000 g Überstand	3	5 200	77 740	1 633	77	0,3	0,021	3
ach 50 % $(NH_4)_2SO_4$	4	5 900	6 195	2 655	126	0,5	0,429	61
000 g Uberstand	5	5 800	3 329	2 357	112	0,4	0,708	101
ach 85 % $(NH_4)_2SO_4$	6	6 580	3 241	2 321	110	0,4	0,716	102
5 000 g Nd in Puffer	7	100	2 634	2 310	109	23,1	0,877	125
ach AcA 34	8	615	1 722	2 091	99	3,4	1,214	173
ach DEAE-cellulose 52	9	183	819	1 940	92	10,6	2,369	338
ach AcA 34	10	415	777	1 560	74	3,8	2,010	287
ach Gly-pro-AH-Sepharose	11	204	157	1 183	56	5,8	7,535	1 076
ach DEAE-cellulose 52	12	133	42	825	39	6,2	19,643	2 806
ach AcA 34	13	124	28	471	22	3,8	16,821	2 403
ach DEAE-cellulose 52	14	8	9	224	11	28,0	24,889	3 556

u Nr 4 : nach 50 %iger Ammoniumsulfatfällung
u Nr 6 : nach 85 %iger Ammoniumsulfatfällung
u Nr 7 : Niederschlag der 25 000 g Zentrifugation in 5 mMol Tris/HCl gelöst
u Nr 8 : Gelfiltration
u Nr 9 : Ionenaustauschchromatographie (mit 0,1 Mol NaCl im Puffer)
u Nr 10 : Gelfiltration
u Nr 11 : Affinitätschromatographie an Gly-pro-AH-Sepharose
u Nr 12 : Ionenaustauschchromatographie (mit diskontinuierlichem NaCl-Gradienten 0,00 - 0,05 Mol)
u Nr 13 : Gelfiltration
u Nr 14 : Ionenaustauschchromatographie (Konzentrierung mit 0,05 Mol NaCl im Puffer)

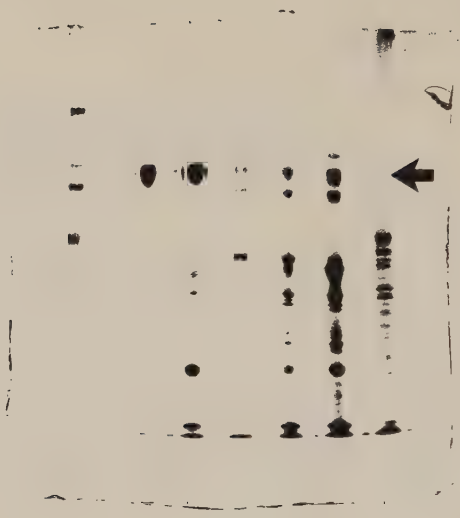


Abb. 23 SDS-Polyacrylamid-Plattengel einer vorausgehenden Anreicherung

1 Markerproteine von oben nach unten :
Myosin, β-Galactosidase, Phosphorylase A,
Bovinserumalbumin, Ovalbumin

2 nach 2) Säulenchromatographie an DEAE-cellulose 52
(Tabelle 4 / Nr 14)

3 nach 1) Säulenchromatographie an DEAE-cellulose 52
(Tabelle 4 / Nr 12)

4 nach Sephadex G-200 (Gelfiltration)
(Tabelle 4 / Nr 10)

5 nach Sephadex G-25 fine (Entsalzungschromatographie)
(Tabelle 4 / Nr 9)

6 25 000 g Niederschlag in Puffer
(Tabelle 4 / Nr 8)

7 Homogenisat
(Tabelle 4 / Nr 1)

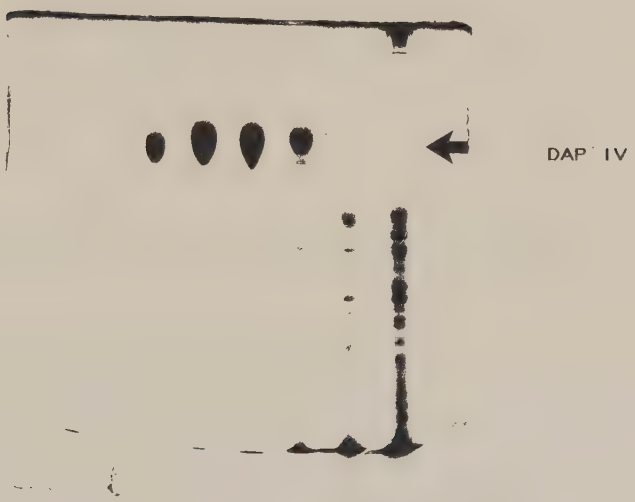


Abb. 24 SDS-Polyacrylamid-Plattengel einer Anreicherung ohne Affinitätschromatographie

1 Markerproteine, von oben nach unten :
Myosin, β-Galactosidase, Phosphorylase A, Bovinserumalbumin, ovalbumin

2 nach 3) Säulenchromatographie an DEAE-cellulose 52
(Tabelle 5 / Nr 13)

3 nach 2) Säulenchromatographie an DEAE-cellulose 52
(Tabelle 5 / Nr 11)

4 nach 1) Säulenchromatographie an DEAE-cellulose 52
(Tabelle 5 / Nr 9)

5 nach Ultrogel AcA 34 (Gelfiltration)
(Tabelle 5 / Nr 8)

6 25 000 g Niederschlag in Puffer
(Tabelle 5 / Nr 7)

7 Homogenisat
(Tabelle 5 / Nr 1)

In den Abb. 23 und 24 ist vor allem die wesentlich effektivere Gelchromatographie an AcA 34 (statt an Sephadex G-25 fine und Sephadex G-200) augenfällig. Wegen der sehr unterschiedlichen Proteinkonzentrationen in den Proben können aus den beiden Abb. keine quantitativen Aussagen abgeleitet werden.

3.5 Affinitätschromatographie mit Lectinen oder mit Antikörpern

Parallel zu den beschriebenen Anreicherungen wurden Versuche mit Concanavalin A durchgeführt, einem Lectin, das für die Chromatographie an, mit Bromcyan aktivierte, Sepharose gebunden wird. Auch mit dieser Affinitätschromatographie ist die Trennung von DAP IV und Aminopeptidase möglich. Lectine binden spezifisch Glycoproteine mit bestimmten Zuckern. Elution erfolgt dann mit einem Zuckergradienten, hier z.B. mit 0,0 - 0,2 Mol α-Methyl-D-mannosid. Die in der Literatur beschriebenen Methoden (50, 124, 125-127) führten auch hier zu keinem Erfolg. Insbesondere gelangen die Aktivierung von Sepharose mit Bromcyan und die anschließende Anknüpfung von Concanavalin A stets nur mit geringer Ausbeute. Die Versuche zur Abtrennung der Aminopeptidase-Aktivität von der DAP IV-Aktivität nach dieser Methode wurden deshalb wieder eingestellt.
Eine weitere Möglichkeit zur Trennung der beiden Enzyme bietet die Gewinnung von Antikörpern gegen DAP IV. Die gereinigten Antikörper werden ebenfalls an einen Träger (Sepharose) gebunden und in die DAP IV-Anreicherung wird eine Chromatographie mit Anti-DAP-IV-Sepharose eingebaut, wodurch DAP IV spezifisch gebunden wird. Elution des Enzyms erfolgt durch Puffer mit Detergens oder durch einen Salzgradienten in Puffer (54, 71, 128, 129). Da die im vorausgehenden Kapitel beschriebene Methode der Affinitätschromatographie an Gly-pro-AH-Sepharose die Trennung der beiden Enzyme ermöglichte, wurden keine Versuche zur

Anti-DAP-IV-Affinitätschromatographie gemacht. Hama et al. (54) beschrieben kürzlich eine DAP IV-Anreicherung aus menschlichen Nieren mit Hilfe der Immuno-Affinitatschromatographie. Dabei wurde eine spezifische Aktivität von 54 Unit / mg Protein erreicht.

3.6 Vergleich der Reinheit von DAP IV aus den Anreicherungsverfahren mit und ohne Affinitätschromatographie

Um die Effektivität der Anreicherungsverfahren von DAP IV mit und ohne Affinitatschromatographie zu verdeutlichen, seien die Enzympräparationen aus beiden Anreicherungen verglichen.

3.6.1 Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität nach dem letzten Anreicherungsschritt

Der wichtigste Schritt in der dritten Aufarbeitung war die Affinitätschromatographie, denn durch sie erfolgte die vollständige Abtrennung der Aminopeptidase-Aktivität. Der Nachweis dafür wurde mit verschiedenen Methoden geführt.

3.6.1.1 Isoelektrische Fokussierung mit anschließender Bestimmung der DAP IV-Aktivität und der Aminopeptidase-Aktivität

Die isoelektrische Fokussierung der Proben mit anschließender Aktivitätsbestimmung erfolgte nach der Methode, wie sie bereits in Kapitel 2.4.4 eingehend beschrieben wurde. Die Abb. 25 und 26 zeigen den Vergleich von DAP IV, mit und ohne Affinitätschromatographie gereinigt, nach der isoelektrischen Fokussierung.
Die Anfärbungen und Aktivitätsbestimmungen der einzelnen Gelstreifen ergaben, daß alle auftretenden Proteinbanden etwa gleiche DAP IV-Aktivität besitzen. Aminopeptidase-Akti-

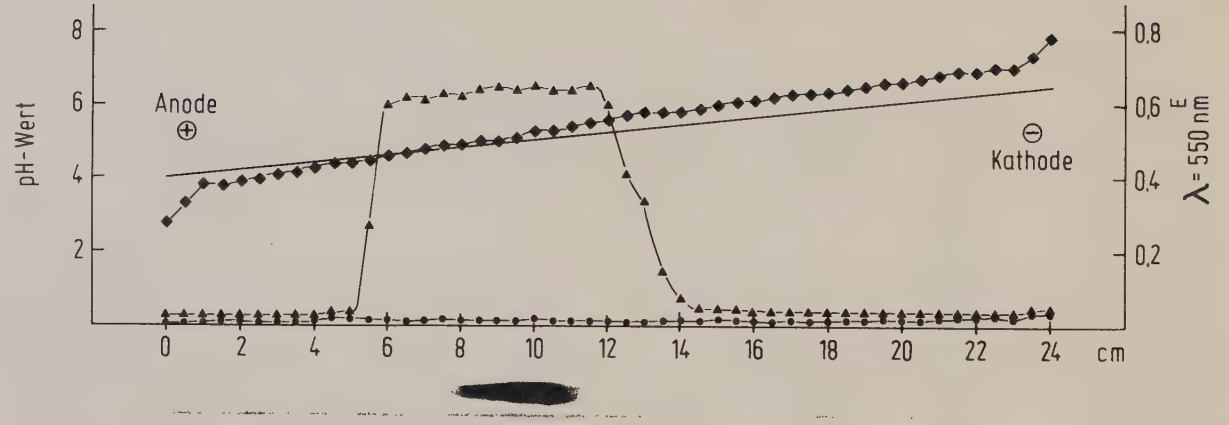


Abb. 25 Isoelektrische Fokussierung von DAP IV ohne Affinitätschromatographie angereichert

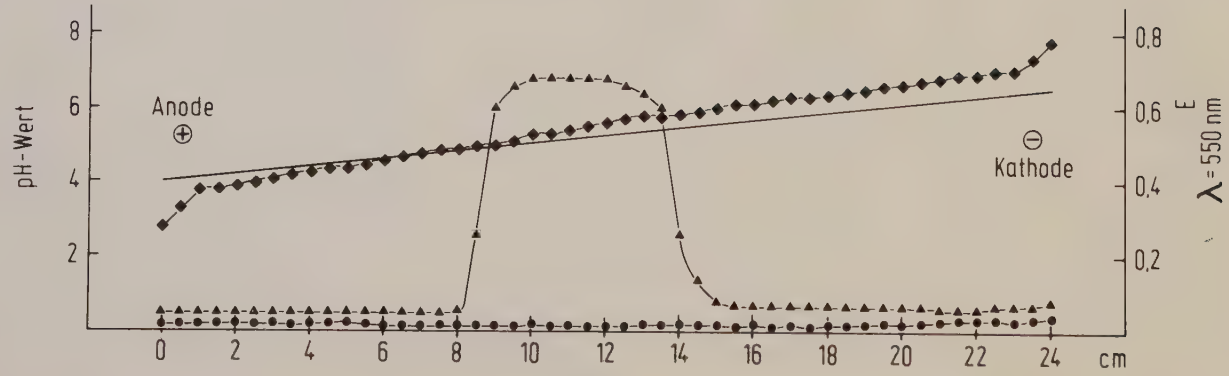


Abb. 26 Isoelektrische Fokussierung von DAP IV mit

vität war mit dieser Methode in keiner der beiden Enzympräparationen nachweisbar. Diese Methode eignete sich somit nicht zum Nachweis der Nebenaktivität in den Enzympräparaten.
Das Vorhandensein mehrerer Proteinbanden mit DAP IV-Aktivitt kann zum einen durch beginnende Proteolyse des Enzyms verursacht sein, zum anderen aber auch von Mikroheterogenitäten der DAP IV herrühren, die schon mehrmals beobachtet worden war (124, 128). Da die DAP IV-Aktivität in allen Banden in gleicher Intensität nachweisbar war, wurde kein Versuch zur Trennung der einzelnen Banden unternommen.

3.6.1.2 Aktivitätsbestimmung mit Leu-2-NNap und Gly-2-NNap als Substrate

Die Aminopeptidase-Aktivitaten in den DAP IV-Präparaten aus den Anreicherungen mit und ohne Affinitätschromatographie wurden mit Leu-2-NNap und Gly-2-NNap bestimmt.

	DAP IV (ohne Affinitätschrom.)	DAP IV (mit Affinitätschrom.)
Aminopeptidase-Aktivität	0,04 U / ml	0,0001 U / ml
Probevolumen	0,1 ml	1,0 ml
Inkubationszeit	5 Minuten	3 Stunden

Im DAP IV-Präparat, das ohne Affinitätschromatographie angereichert worden war, erfolgte schon nach 5 minütiger Inkubation der Substrate mit nur 0,1 ml Enzymlösung bei 37° C Spaltung der Substrate in nachweisbaren Mengen. Umgerechnet auf eine Minute beträgt die Aminopeptidase-Aktivität 0,04 Unit / ml Lösung. DAP IV mit Affinitätschromatographie angereichert, zeigte selbst nach 3 Stunden Inkubation der Substrate mit 1,0 ml DAP IV-Lösung (10 mal soviel wie vorher) noch keine meßbare Menge an Spaltprodukten (0,0001 entspricht der Meßgenauigkeit des verwendeten

Gerätes). Die Enzymbestimmungen wurden nach der im Kapitel 2.4.3 angegebenen Methode durchgeführt. Die Aktivitätsbestimmung durch Spaltung des Substrates und Messung der Fluoreszenz des freigesetzten Naphthylamins (NNap) stellt eine wesentlich empfindlichere Methode dar, als die Substratspaltung mit anschließender Fabstoffbildung und dessen Messung, wie unter 3.6.1.1 beschrieben.
Mit dieser Methode konnte deutlich gemacht werden, daß in den DAP IV-Anreicherungen nach der zweiten Methode noch störende Aminopeptidase-Aktivität vorhanden ist. Im DAP IV-Präparat, entsprechend dem dritten Verfahren angereichert, war trotz der wesentlich längeren Spaltzeit und des größeren Probeneinsatzes keine Aminopeptidase-Aktivität nachweisbar.

3.6.1.3 Aktivitätsbestimmung durch Nachweis von Aminosäuren mit GC / MS

Die sehr empfindliche Nachweismethode von aus Dipeptiden durch Aminopeptidase abgespaltenen Aminosäuren erfolgte mit GC / MS. Dazu wurde, wie unter 6.5 genauer beschrieben, eine Dipeptidmischung über längere Zeit zusammen mit DAP IV aus verschiedenen Anreicherungsmethoden bei 37° C inkubiert. Als Dipeptidmischung (Mischung I) wurde verwendet : Val-Leu, Ser-Leu, Thr-Phe, Phe-Val, Glu-Ala, Asp-Pro, Met-Pro und Val-Tyr. Die Ergebnisse der Untersuchung im Vergleich zu einem Blindwert (Mischung I ohne Enzym inkubiert) zeigt die folgende Tabelle.

	gefundene Aminosäuren	Spaltzeit	Mischung I
Blindwert	Ser, Pro, Asp	15 Stunden	10 nMol
DAP IV ohne Affinitätschrom.	Val, Thr, Ser, Leu, Pro, Asp, Glu, Phe, Tyr	16,5 Stunden	5 nMol
DAP IV mit Affinitätschrom.	Ser, Pro, Asp	15 Stunden	10 nMol

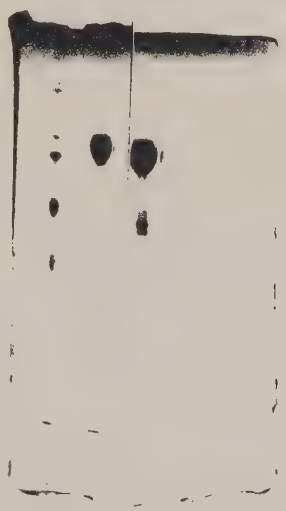
Die Enzymkonzentration war jeweils 0,2 Unit pro Spaltansatz, die Dipeptidkonzentration pro Dipeptid in der Mischung ist in der Tabelle unter Mischung I angegeben. Selbst bei dieser sehr empfindlichen Nachweismethode waren gegenüber den schon im Blindwert vorhandenen Aminosäuren keine neuen Aminosäuren nachweisbar. Mit den Nachweismethoden, die zur Verfügung gestanden haben, war somit im DAP IV-Präparat der dritten Anreicherung keine Aminopeptidase-Aktivität mehr nachweisbar. Die im Blindwert vorhandenen Aminosäuren sind als Verunreinigungen des Ausgangsmaterials anzusehen.

3.6.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von DAP IV mit und ohne Affinitätschromatographie angereichert

Abb. 27 zeigt den Vergleich von DAP IV mit und ohne Affinitätschromatographie angereichert.

Abb. 27 SDS-Polyacrylamid-Plattengel

1 Markerproteine von oben nach unten :
Myosin
β-Galactosidase
Phosphorylase A
Bovinserumalbumin
Ovalbumin
2 DAP IV (Anreicherung mit Affinitätschromatographie)
3 DAP IV (Anreicherung ohne Affinitätschromatographie)



Bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese erhält man für hochgereinigtes DAP IV eine Bande, bestehend aus zwei gleichlaufenden Untereinheiten. Das DAP IV-Präparat aus der zweiten Anreicherung enthält noch zwei weitere, gut sichtbare Banden im Molekulargewichtsbereich 50 000 - 60 000, die im mit Affinitätschromatographie angereicherten DAP IV-Präparat vollständig abgetrennt worden sind. Ob diese Banden mit der Aminopeptidase-Aktivität in Zusammenhang stehen, wurde nicht geprüft.

3.8.3 Disk-Elektrophorese

Bei der Disk-Elektrophorese ohne SDS erhält man für DAP IV eine Bande (Abb. 28), die für die DAP IV-Präparation aus der zweiten Anreicherungsmethode etwa doppelt so breit ist, wie beim DAP IV-Präparat, das mit Affinitätschromatographie gereinigt worden war. Diese Verbreiterung ist sicherlich in erster Linie auf ungenügend abgetrennte Verunreinigungen zurückzuführen, daneben möglicherweise auch auf Proteolyseprodukte der DAP IV.

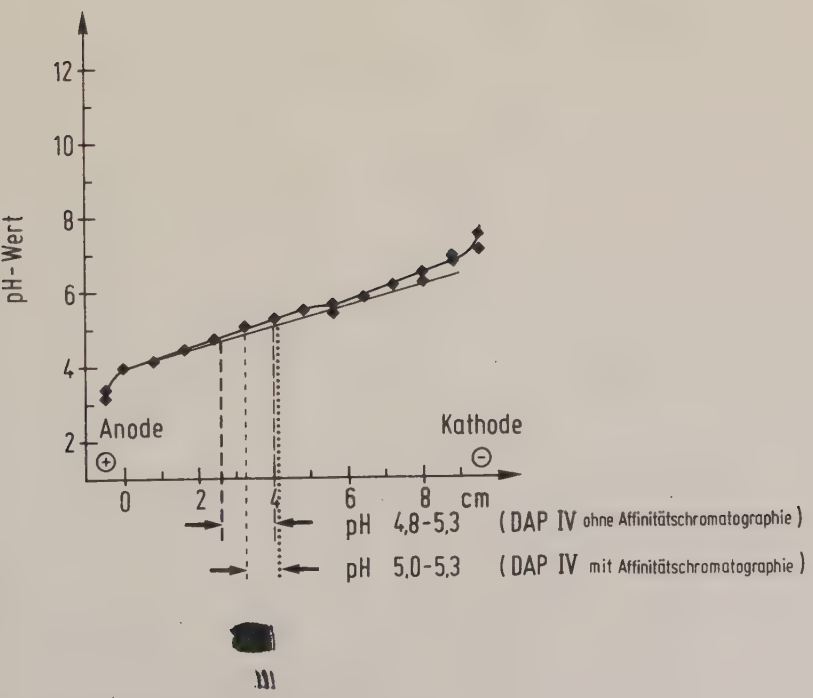
Abb. 28 Disk-Elektrophorese von nativem DAP IV

1 DAP IV (Anreicherung mit Affinitätschromatographie)
2 DAP IV (Anreicherung ohne Affinitatschromatographie)

3.6.4 Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Der isoelektrische Punkt des nach der zweiten bzw. dritten Methode angereicherten Enzyms wurde bestimmt wie in Kapitel 2.6 angegebenen. Hierbei ergibt sich im Polyacrylamidgel mit pH-Gradient 4,0-6,5 ein isoelektrischer Punkt von 5,0-5,3 für DAP IV mit Affinitätschromatographie angereichert und von 4,5-5,2 für DAP IV ohne Affinitätschromatographie angereichert (Abb. 29), dies entspricht auch dem mit Substrat und Fast Garnet GBC gemessenen Aktivitätsbereich im gleichen Gel (siehe 3.6.1.1).

Abb. 29 Isoelektrischer Punkt von DAP IV mit und ohne Affinitätschromatographie angereichert



3.7 Molekulargewichtsbestimmungen

Zur zusätzlichen Charakterisierung des isolierten Enzyms wurde das Molekulargewicht (MG) des nativen und des denaturierten Enzyms bestimmt.

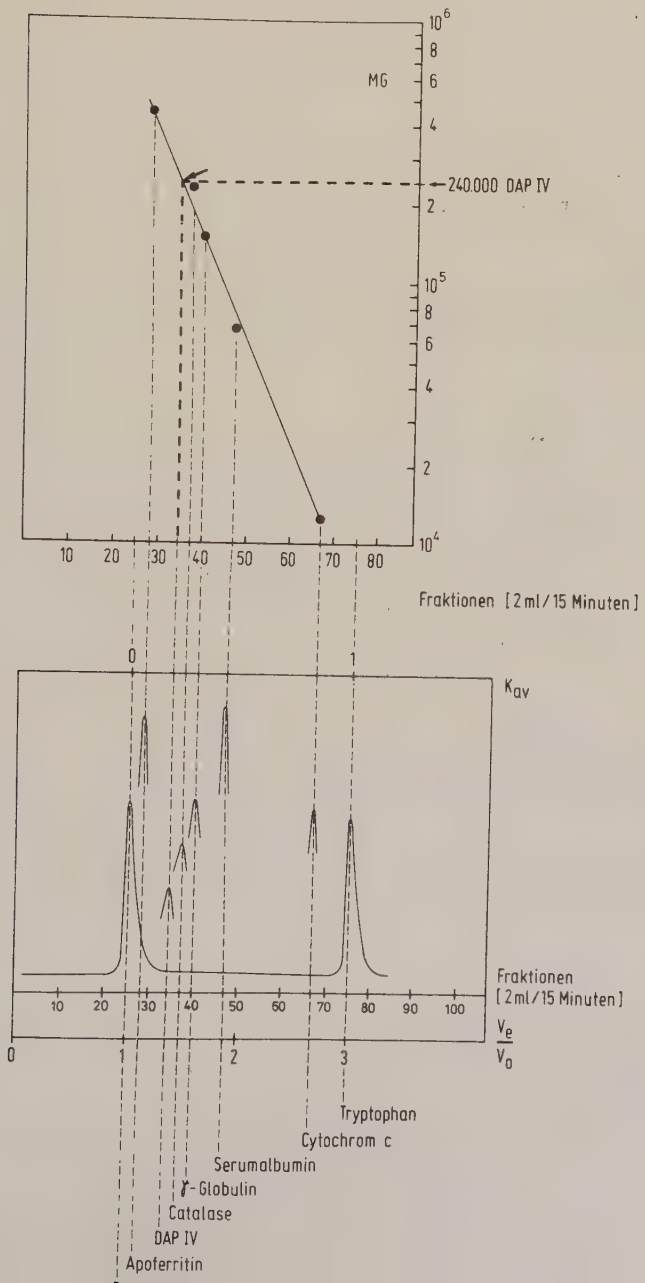
3.7.1 Bestimmung des MG vom nativen Enzym DAP IV durch Chromatographie an Sephadex G-200

Für die MG Bestimmung des nativen Enzyms DAP IV durch Chromatographie an Sephadex G-200 wurde mit Affinitätschromatographie gereinigtes Enzym verwendet. Als Marker kamen folgende Proteine mit nachstehenden MG zur Anwendung :

Apoferritin (Pferdemilz)	:	MG 480 000
Catalase (Rinderleber)	:	MG 230 000
γ-Globulin (Humanserum)	:	MG 150 000
Serumalbumin (Rind)	:	MG 68 000
Cytochrom c (Pferdeherz)	:	MG 12 500

Die für die Bestimmung verwendete Säule (1,5 x 85 cm) wird mit 5 mMol Tris / HCl pH 7,9 zwei Tage äquilibriert. Der Durchfluß beträgt 2,0 ml / 15 Minuten (das entspricht einer Fraktion). Laufpuffer ist 5 mMol Tris / HCl pH 7,9. Von den Markerproteinen werden jeweils 2,5 mg in 250 μl Laufpuffer auf die Säule aufgetragen. Für jedes einzelne Markerprotein wird das Elutionsvolumen (V_e) und das Verhältnis von Leervolumen (Ausschlußvolumen) (V_o) zu V_e bestimmt. Der Nachweis der eluierten Proben erfolgt durch Messen der Extinktionen bei 280 nm und 230 nm, des Farbstoffes oder der Aktivität. Die Vergleichbarkeit der einzelnen Läufe mit den Markerproteinen und dem Enzym DAP IV ist durch Zugabe von Dextranblau und Tryptophan zu jedem Säulenlauf gewährleistet. Dextranblau (K_{av} = 0 und MG 2 000 000) und Tryptophan (K_{av} = 1 und MG 200) kennzeichnen die Trennstrecke bei jedem Lauf (130). K_{av} ist ein Parameter, der die

Abb. 30 Molekulargewichtsbestimmung des nativen Enzyms DAP IV aus Schweinenieren mit Hilfe von Markerproteinen an Sephadex G-200



eigentliche Trennstrecke angibt (Abb. 30). Das MG von nativem DAP IV wurde wie in Abb. 30 angegeben ermittelt.
Für natives DAP IV ergibt sich aus dem Whitaker-Diagramm (131) ein MG von 240 000 mit einer mittleren Abweichung von ± 10 000.

3.7.2 Bestimmung des MG von denaturiertem DAP IV mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Aus den SDS-Polyacrylamidgelen mit den wichtigsten Reinigungsschritten der dritten Methode wurde das MG des denaturierten Enzyms DAP IV bestimmt. Die verwendeten Markerproteine waren :

Myosin (Kaninchenmuskel)	: MG	250 000
β-Glactosidase (E. coli)	: MG	116 000
Phosphorylase A (Kaninchenmuskel)	: MG	93 000
Serumalbumin (Rind)	: MG	68 000
Ovalbumin (Huhn)	: MG	43 000

Aus Abb. 31 ist die graphische Ermittlung des MG von den gleichlaufenden Untereinheiten von DAP IV mit Hilfe der Markerproteine zu ersehen.
Aus der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von hochgereinigtem Enzym nach der dritten Anreicherung ergibt sich für die Untereinheiten von DAP IV ein durchschnittliches MG von 130 000 mit einer mittleren Abweichung von ± 5 000. Die zwei gleichlaufenden Untereinheiten, die auch in der Literatur erwähnt werden (33, 50, 71), ließen sich auch in SDS-Polyacrylamidgelen mit pH-Gradienten nicht auftrennen.

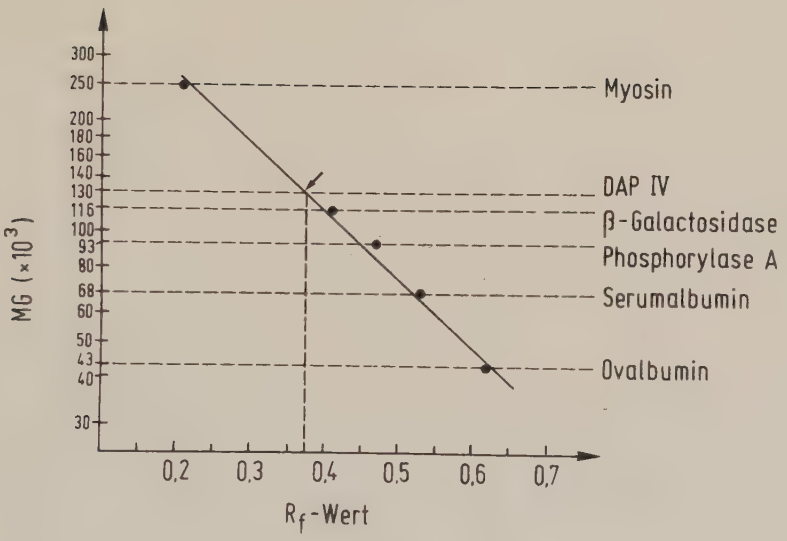


Abb. 31 Molekulargewichtsbestimmung des denaturierten Enzyms DAP IV mit Hilfe der SDS-Elektrophorese

3.8 Vergleich der Enzymcharakteristika von DAP IV aus Schweinenieren mit denen in der Literatur

Die Enzymcharakteristika von DAP IV aus Schweineniere stimmen weitgehend mit denen überein, die von anderen Autoren angegeben werden (Tabelle 7).
Die unterschiedlichen Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen von denaturiertem zu nativem Enzym liegen in der Tatsache, daß DAP IV ein Glycoprotein mit ca. 18 % Kohlenhydraten ist und daher in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese im Gegensatz zu reinen Proteinen verändertes Verhalten zeigt (geringere Beweglichkeit, da Glycoproteine nicht gänzlich an SDS binden) (36).

Tabelle 7 Vergleich von Enzymcharakteristika der DAP IV aus Schweinenieren

	eigene Versuche	Literatur
pH-Optimum	7,8 - 9,0 (-2-NNap)[1]	8,7 (-p-NA)[2] (54)
		7,6 - 7,8 (-p-NA)[2] (31)
pH-Stabilität	3,5 - 11,0	
Temperatur-Optimum	35 - 45° C	
Temperatur-Stabilität	bis 45° C (50° C)	
MG natives Enzym	240 000 ± 10 000 (Sephadex G-200)	230 000 (Sephadex G-200) (32)
		270 000 (Sephadex G-200) (31, 54)
		230 000 (Ultrogel AcA 34) (71)
MG denaturiertes Enzym	130 000 ± 5 000 (SDS-Elektrophorese)	130 000 (33, 34, 36) (SDS-Elektrophorese)
		137 000 (71) (SDS-Elektrophorese)
		100 000 ± 10 000 (36) (6 M Guanidinium x HCl, Sephadex G-200)
Zahl der Banden bei der SDS-Elektrophorese	1 Bande	1 Bande (34, 36, 54, 71)
Zahl der Untereinheiten	2	2 (34, 49)
Isoelektrischer Punkt	5,0 - 5,3	6,4 (32)

(-2-NNap)1 : mit Gly-pro-2-NNap als Substrat
(-p-NA)2 : mit Gly-pro-p-NA als Substrat

4. ZUSAMMENFASSUNG

der Enzymanreicherungen von DAP IV und der Enzymcharakteristika

DAP IV wurde bereits aus vielen verschiedenen Organen der unterschiedlichsten Spezies isoliert und angereichert (siehe 1.2.2). Während die Substratspezifität (N-terminale Abspaltung von Dipeptiden aus Oligo- oder Polypeptiden; beide Aminosäuren des Dipeptides müssen in der L-Konfiguration vorliegen; Spaltung nur, wenn Pro oder Ala an 2. Stelle im Dipeptid stehen (vom Aminoende her gesehen); die 3. Aminosäure, vom N-Terminus des Peptides her gesehen, darf nicht Pro oder Hyp sein) bei allen DAP IV Enzymen identisch ist, unterscheiden sich die Enzyme in ihrem Proteinanteil manchmal erheblich. Dies, und auch das Vorkommen von in Lösung befindlichen Enzymen (Serum, Speichel, Leber) neben membrangebundenen Enzymen, erfordert unterschiedliche Aufarbeitung bei der Anreicherung und erklärt auch die teilweise stark voneinander abweichenden Enzymcharakteristika (z. B. Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt).
In der vorliegenden Arbeit ist die Anreicherung von DAP IV aus Schweinenieren beschrieben. Die Nieren wurden frisch vom Schlachthof bezogen und bis zur Verwendung bei -20° C aufbewahrt. Die Anreicherungen wurden durch Bestimmung der Proteinkonzentration und der Enzymaktivität kontrolliert. Protein wurde anfangs mit der Biuretmethode in Anlehnung an das Verfahren von Beisenherz und nach der Methode von Lowry modifiziert nach Markwell bestimmt, später nur noch nach Lowry, wegen der höheren Empfindlichkeit der letzteren Methode. Die Bestimmungen der DAP IV-Aktivität und der Aminopeptidase-Aktivität erfolgten mit den Substraten Gly-pro-2-NNap bzw. Leu-2-NNap und Gly-2-NNap. Aus den

Vorversuchen ergab sich für den DAP IV-Nachweis ein Aktivitätsmaximum im pH-Bereich von 7,8 - 9,0 und im Temperaturbereich von 35 - 45° C. Die Aktivitätsbestimmungen von DAP IV wurden deshalb stets bei pH 8,0 und 37° C durchgeführt. Ferner konnte aus den Vorversuchen abgeleitet werden, daß bei einer Autolyse von 10 - 20 Stunden bei pH 3,8 und ca. 40° C optimale Solubilisierung des Enzyms erfolgt und durch 50 - 85 %ige Ammoniumsulfatfällung die besten Voraussetzungen für die anschließenden säulenchromatographischen Reinigungen geschaffen werden. Zur Kontrolle dieser Chromatographien wurde zusätzlich nach jedem Lauf eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der interessanten Fraktionen durchgeführt. Die daraus erhaltenen Ergebnisse bezüglich DAP IV-Gehalt stimmten mit den Aktivitätsbestimmungen der entsprechenden Fraktionen qualitativ überein. Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen konnte zum einen die Funktionstüchtigkeit der Säulen überwacht werden, zum anderen war dadurch zu jedem Zeitpunkt eine Aussage über die Effektivität der gerade durchgeführten Anreicherung möglich. Durch Verwendung zweier, in der neueren Literatur beschriebenen Trennmaterialien (AcA 34 zur Gelfiltration und Gly-pro-AH-Sepharose zur Affinitätschromatographie) konnte die Effektivität der DAP IV-Anreicherung gegenüber früheren Versuchen wesentlich verbessert werden. Dabei gelang die vollständige Abtrennung der Aminopeptidase-Aktivität nach einer neu entwickelten Methode und die Erhöhung der spezifischen Aktivität auf 24,9 Unit / mg Protein (von bisher weniger als 10 Unit / mg Protein) bei gleichzeitiger Verkürzung der Anreicherungsdauer auf wenige Wochen (bisher mehrere Monate). Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen mit den wichtigsten Anreicherungsschritten im Überblick und die Tabellen mit jeweils einer Anreicherung der drei durchgeführten Methoden lassen die Fortschritte in den einzelnen Anreicherungsverfahren erkennen. Die Enzymcharakteristika von DAP IV aus Schweineniere stimmen weitgehend mit denen überein, die in der Literatur angegeben sind.

5. DAP I

Das Enzym DAP I spaltet ebenso wie DAP IV vom Aminoende eines Peptides nacheinander Dipeptide ab. Im Gegensatz zu DAP IV werden von diesem Enzym nur die Bindungen gespalten, an denen kein Pro beteiligt ist. Die Enzympräparation wurde von Boehringer Mannheim Tutzing bezogen. Nach Überprüfung der Aktivität mit dem von Boehringer Mannheim zur Verfügung gestellten Substrat ergab sich, daß die auf dem Etikett gemachten Angaben überhöht waren, was durch Versuche des Kontrollabors in Tutzing bestätigt wurde. Um die Enzymchargen mit DAP I weiterhin auf ihre, in der Kennzeichnung angegebene, Aktivität überprüfen zu können, wurde Gly-phe-p-NA synthetisiert, da das Substrat zur Zeit nicht erhältlich war. Wegen der bei der Synthese erreichten geringen Ausbeute, der vollständigen Razemisierung (wie auch bei Planta und Gruber (110) beschrieben) und in der Hauptsache wegen der geringeren Empfindlichkeit von Gly-phe-p-NA als Substrat wurde die DAP I-Aktivität später nur noch mit Gly-phe-2-NNap bestimmt (2.4.1.2). Eine Untersuchung der Enzymcharakteristika von DAP I erfolgte nicht.

5.1 Synthese von Gly-phe-p-NA

Zur Überprüfung der Aktivität von DAP I wurde Gly-phe-p-NA nach der Phosphorazomethode (132, 133) synthetisiert. Die Ausgangssubstanzen sind :

Benzyloxycarbonyl-glycyl-phenylalanin (Z-gly-phe)
Pyridin wasserfrei
Phosphortrichlorid (PCl_3) destilliert
Bromwasserstoff / Eisessig (HBr / AcOH) 4 N
p-Nitroanilin (p-NA)

a) Z-gly-phe-p-NA

Die Lösung von 1 mMol (140 mg) p-NA in 2 ml absolutem Pyridin wird auf 3-5° C gekühlt : man tropft 0,5 mMol (30 µl) frisch destilliertes Phosphortrichlorid zu und rührt eine Stunde bei 0° C. Hierzu gibt man die auf 0° C gekühlte Lösung von 1 mMol Z-gly-phe-p-NA (360 mg) in 3 ml absolutem Pyridin und rührt über Nacht bei Raumtemperatur. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt (Kieselgel F_{254}) im Laufmittelsystem Cyclohexan / Chloroform / Eisessig : 45 / 45 / 10. Nach 25 Stunden wird der Ansatz am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht, der Rückstand in Essigester aufgenommen und mit bidest. Wasser, 5 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung, 2 N Salzsäure und dann wieder mit bidest Wasser gewaschen. Die Essigesterphase wird getrocknet und aus Essigester / Hexan umkristallisiert : farblose Nadeln vom Schmelzpunkt 164° C. Die Elementaranalyse für Z-gly-phe-p-NA ($C_{25}H_{24}O_6N_4$) (MG 476,69) ergab : berechnet C 63,03 % / H 5.04 % / N 11,76 % und gefunden C 62.40 % / H 4.98 % / N 11,74 %.

b) Gly-phe-p-NA :

1 mMol (480 mg) Z-gly-phe-p-NA werden in 5 ml Eisessig-Bromwasserstoffsäure (4 N) eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Gly-phe-p-NA wird mit Äther als Hydrobromid ausgefällt. Man löst das Salz in gesättigter Natriumbicarbonatlösung und schüttelt das Gly-phe-p-NA in Essigester aus. Die organische Phase wird mit Wasser neutral gewaschen, getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht. Nach dem Umkristallisieren aus Äthanol / Wasser erhält man farblose Kristalle vom Schmelzpunkt 139° C (Referenz 140° C). Die Elementaranalyse für Gly-phe-p-NA ($C_{17}H_{18}O_4N_4$) (MG 342,42) ergab : berechnet C 59,65 % / H 5,26 % / N 16,37 % und gefunden C 59,60 % / H 5,21 % / N 16,05 %. Die mit HPLC, MS, UV- und IR-Spektrometrie durchgeführten Reinheitsvergleiche des synthetisierten Gly-phe-p-NA mit dem von Boehringer Mannheim ergaben in allen Versuchen identische Ergebnisse : Hauptionen im MS bei m/e 342 {Molekülion}, 137 {p-NA} und 92 {137- NO_2}, 204/205/206 {Glycylphenylrest}, 91 {C_7H_7}, 268 {M- H_2N-CH_2-CO-HN}, 75 {H_2N-CH_2-CO-NH}, 120 {CO-NH-Ph} und 177 {268- C_7H_7}; das Absorptionsmaximum liegt bei λ = 326 nm, die charakteristischen Banden im IR sind Valenzschwingungen bei den Wellenzahlen 3340-3140 (prim. und sek. Amin), 3050 (aromatische C-H), 2930 (aliphatische C-H), 1660 (Amid I), 1540 (Amid II), 1570 bzw. 1350 (C-NO_2) und 1600 bzw. 1500 cm^{-1} (Aryl-H). Nur bei der Messung des Drehwertes ergab sich für die synthetisierte Verbindung eine vollkommene Razemisierung, während die Referenzprobe folgende Drehwerte hatte : $[\alpha]_{20°C}^{546\ nm}$ = + 58,6 bzw. $[\alpha]_{20°C}^{589\ nm}$ = + 46,0. Das synthetisierte Gly-phe-p-NA wurde während der Reinigung vermutlich einmal im alkalischen Milieu zur Trockene einrotiert. Eine vollständige Razemisierung beobachteten auch Planta und Gruber (110) bei der Synthese dieser Verbindung.

6. ERGEBNISSE und DISKUSSION

der Peptidsequenzierungen

6.1 Ermittlung des pH-Optimums einer Mischung aus DAP I und DAP IV, für die Peptidsequenzierung

Wie in der Einleitung beschrieben, spalten DAP I und DAP IV bei Peptiden vom Aminoende her Dipeptide ab. Die Spezifität der Enzyme ergänzt sich, so daß mit einer Mischung beider Enzyme optimal die meisten Peptide enzymatisch in eine Mischung von Dipeptiden abgebaut werden können. Die pH-Optima für die Abspaltung von Dipeptiden liegen für DAP I bei 5-6 und für DAP IV im Bereich pH 8-9. DAP I zeigt bei pH 7-8 beträchtliche Transferase-Aktivität. Um den für die Peptidspaltung mit einem Enzymgemisch günstigen pH-Bereich zu ermitteln, wurde für beide Enzyme getrennt die Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert ermittelt und in Abb. 32 dargestellt. Dazu wurden Lösungen der Zusammensetzung : 19,5 ml bidest. Wasser, 0,32 ml Salzsäure 1 N, 0,02 ml Essigsäure 100 %ig, 0,2 ml Titriplex III-Lösung (EDTA) 0,1 Mol und 0,02 ml Mercaptoäthanol mit Ammoniaklösung (1 %ig und 10 %ig) auf pH-Werte zwischen 5 und 9 eingestellt. Nach Zugabe von DAP I und DAP IV, in jeweils gleichen Mengen, wurde eine Stunde bei 37° C inkubiert. Die anschließende Bestimmung der Enzymaktivitäten in den verschiedenen Pufferlösungen erfolgte entsprechend 2.4.1.2 für DAP I mit Gly-phe-2-NNap als Substrat und 2.4.2 für DAP IV mit Gly-pro-2-NNap als Substrat. Die jeweils höchste in einem Puffer gemessene Aktivität wurde gleich 100 % gesetzt.

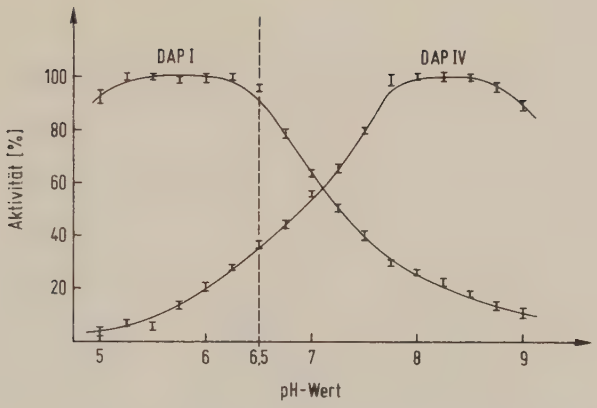


Abb. 32 pH-Optimum einer Mischung aus DAP I und DAP IV

Abb. 32 zeigt den Schnittpunkt der pH-Kurven von DAP I und DAP IV bei pH 7 – 7,25. In diesem Bereich besitzt jedes der beiden Enzyme etwa 60 %ige Aktivität. Da bei diesen pH-Werten noch mit Transpeptidase-Aktivität von DAP I gerechnet werden muß, wurden die im folgenden beschriebenen Enzymspaltungen bei pH 6,5 durchgeführt. Dieser pH-Wert wurde auch von Caprioli et al. (7) vorgeschlagen. DAP I besitzt bei diesem pH-Wert 90 % der optimalen Aktivität und DAP IV ca 40 %. Diese Werte gelten nur für die oben angegebenen Versuchsbedingungen, sie können bei anderen Puffern und anderen Substraten verändert sein. Ferner wird dadurch keine Aussage über das Verhältnis der Umsetzungsraten im pH-Optimum der beiden Enzyme zueinander gemacht. Im Gegensatz zu Caprioli wird von Krutzsch et al. (92) für die Peptidsequenzierung mit einer Mischung aus DAP I und IV ein pH von 7,2 verwendet. Dies entspricht zwar dem Schnittpunkt der beiden pH-Kurven und bedeutet somit optimale Aktivität beider Enzyme in Mischung, aber die störende Transpeptidase-Aktivität von DAP I bleibt hierbei unberücksichtigt.

6.2 Untersuchung von Substanzen, die in den GC-Spektren zum erhöhten Untergrund beitragen

Nach der Bestimmung des pH-Optimums für die verwendete Enzymmischung ergab sich bei den ersten Spaltversuchen das Problem eines erhöhten Untergrundes gegenüber reinen Dipeptidmischungen. Mit einer Mischung aus reinen Dipeptiden in der Konzentration von 1-5 nMol ist eine chemische Derivatisierung mit anschließender GC / MS Analyse ohne Schwierigkeiten möglich (Abb. 33).
Die im GC aufgetrennten Dipeptide einer Mischung von PFP-Dipeptidmethylestern sind mittels MS einwandfrei identifizierbar und der Untergrund ist dabei minimal (Abb. 33). Bei den später beschriebenen Peptidsequenzierungen stellte sich heraus, daß niedermolekulare Verunreinigungen von Losungsmitteln und Wasser, sowie Begleitstoffe in den Enzympraparationen und Peptiden die Gaschromatogramme der Peptidgemische komplizieren können. Es waren deshalb Vorversuche notwendig, um die möglichst gute Abtrennung dieser Komponenten zu erreichen, bzw. ihre GC- und MS-Eigenschaften kennenzulernen.

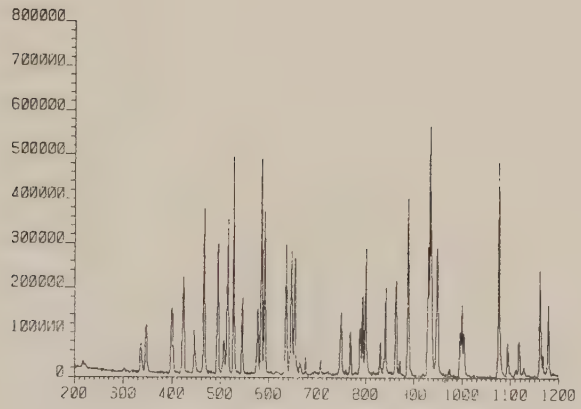


Abb. 33 GC einer Mischung von Perfluorpropionyl-dipeptidmethylestern
335,346/Ala-Ala, 401/Ala-Gly, 446/Gly-Ala, 466/Ala-Thr, 495/Ala-Pro, 515/Asp-Ala, 528/Val-Pro, 545/Gly-Val, 577/Asp-Gly, 585/Ser-Pro, 592/Ile-Pro, 637/Ala-Asp, 647/Pro-Leu, 654/Pro-Ile, 750/Gly-Asp, 769/Pro-Pro, 794/Met-Gly, 801/Val-Glu, 842/Val-Met, 863/Phe-Gly, 871/Met-Pro, 888/Val-Phe, 928/Phe-Leu, 934/Thr-Ala, 938/Pro-Ser, 995/Ala-Tyr, 1000/Met-Asp, 1006/Tyr-Gly, 1077/Phe-Asp und Lys-Ala, 1095/Pro-Tyr, 1118/Lys-Val, 1179/Phe-Glu
Bedingungen für Derivatisierung und GC / MS - Analyse siehe Kapitel 2.12.2

6.2.1 Abtrennung von Begleitstoffen der Enzyme DAP I und DAP IV

Als erstes wurden die Enzyme auf ihre Begleitstoffe untersucht. Die Enzympräparationen mit DAP I und DAP IV enthalten Beimengungen für erhöhte Stabilität bei der Lagerung (DAP I : 50 % Glycerin) bzw. Verunreinigungen (DAP I und DAP IV : Pufferreste aus den Anreicherungen, niedermolekulare Verbindungen aus den Säulenmaterialien, u.a. Substanzen), die die Identifizierung von Aminosäuren und Dipeptiden mittels GC / MS stören können, indem sie die Peaks im Gaschromatogramm überdecken (Abb. 34). Diese störenden Substanzen können durch Mikro-Dialyse (siehe 2.6) zum überwiegenden Teil entfernt werden (Abb. 35).

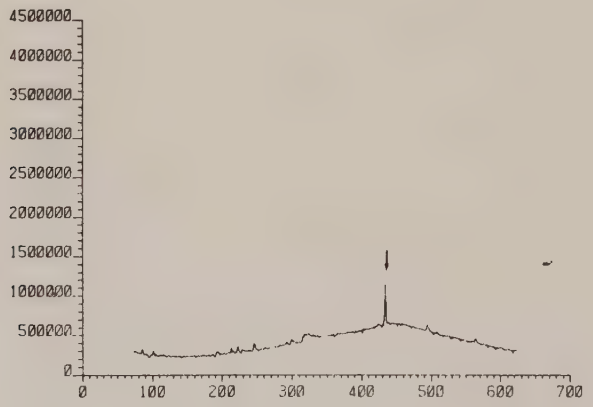


Abb. 34 Mischung I mit undialysiertem DAP I inkubiert und derivatisiert
Spec 433/Dioctylphthalat (DOP)

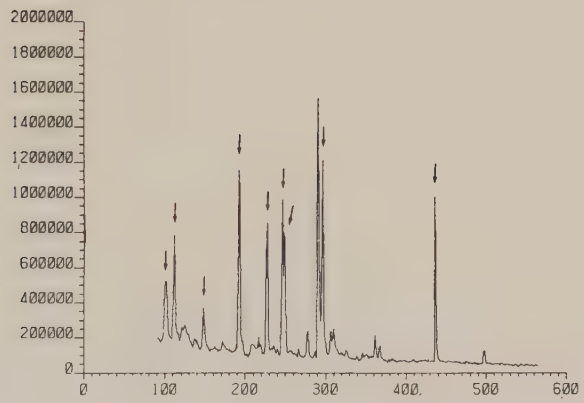


Abb. 35 Mischung I mit dialysiertem DAP I inkubiert und derivatisiert.
Spec 102/Ser-Leu, 112/Val-Leu, 148/Glu-Ala, 194/Asp-Pro, 228/Thr-Phe, 247/Phe-Val, 250/Met-Pro, 297/Val-Tyr, 448/DOP

Die hier und in den folgenden Abbildungen benützten Kurzschreibweisen sind :

Spec x : Peak mit der Retentionszeit x im Gaschromatogramm, für den das Massenspektrum eine

Aminosäure : (= PFP-Aminosäure-methylester oder PFP-Aminosäure-isopropylester)

oder ein

Dipeptid : (= PFP-Dipeptid-methylester oder PFP-Dipeptid-isopropylester)

ergab.

In den Abbildungen sind Gaschromatogramme einer Dipeptidmischung (Mischung I) zu sehen, die mit nicht dialysiertem DAP I inkubiert wurden (Abb. 34) bzw. mit DAP I, das zwei Stunden gegen bidest. Wasser dialysiert worden war (Abb. 35). Eine zweistündige Dialyse erwies sich hierbei als ausreichend, wie gegen Ende dieses Kapitels beschrieben wird. Die anschließende Derivatisierung erfolgte mit 3 N methanolischer Salzsäure und Perfluorpropionsäure (MeOH/HCl (3 N) und PFPA), wie unter 2.12.2 beschrieben. In beiden Fällen wurde dann die Probe in 20 µl CH_2Cl_2 aufgenommen und davon jeweils 2 µl (Split 1 : 5) in einen GC mit CP Sil 5 Säule injiziert. Die verwendete Mischung I enthielt von den folgenden Dipeptiden jeweils 25 nMol : Val-Leu, Phe-Val, Met-Pro, Ser-Leu, Glu-Ala, Val-Tyr, Thr-Phe und Asp-Pro.
Aus den beiden Abbildungen ergibt sich, daß durch Dialyse von DAP I die Hauptmenge an Glycerin entfernt wird. Die Dipeptidpeaks, von denen anfangs nur die Spitzen zu erkennen waren, sind jetzt gut zu sehen.
In den Vorversuchen zur Mikro-Dialyse wurde eine Mischung aus 50 % Glycerin in 50 mMol NaCl verschiedene Zeiten dialysiert, anschließend trimethylsilyliert und mit GC untersucht. Dabei zeigte sich, daß Glycerin nach zwei Stunden so weit entfernt ist, daß keine Störung mehr erfolgt. Aus diesem Grund wurde DAP I und in der Regel auch DAP IV in den folgenden Versuchen, vor der Verwendung zur Sequenzanalyse, stets zwei Stunden gegen bidest. Wasser dialysiert. Die Wiederfindung der DAP I- und DAP IV-Aktivität nach einer Dialysedauer von zwei Stunden lag stets zwischen 80 und 95 %. Die Angaben von Budowle (119) konnten somit bestätigt werden. Bei den Vorversuchen zeigte sich, daß während der Dialyse aus den verwendeten Schläuchen Substanzen herausgelöst werden, die im Gaschromatogramm zusätzliche Peaks verursachten. Die Dialyseschläuche wurden daher in ca. 3 x 3 cm große Membranblättchen zerschnitten und etwa 10 x mit bidest. Wasser ausgekocht (wie unter 2.8 beschrieben). Eine eingehendere Diskussion zur Untersuchung der Dialysemembranen erfolgt im folgenden Kapitel.

6.2.2 Bidest. Wasser vor und nach der Mikro-Dialyse

Zur Klärung des starken Untergrundes in den Gaschromatogrammen wurde bidest. Wasser vor und nach der Mikro-Dialyse untersucht. Bidest. Wasser, das von einer Anlage entnommen wurde, die vorher schon etwa eine halbe Stunde gelaufen war und bei der das Wasser, nach der Destillation, nur mit Glas in Berührung kam, ergab genauso niedrige Werte an Verunreinigungen wie bidest. Wasser von Baker (für die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie). Abb. 36 und 37 zeigen die Gaschromatogramme von gleichen Mengen bidest. Wasser mit MeOH / HCl (3 N) und PFPA derivatisiert und auf einer OV 1701 Säule aufgetrennt.

Stellvertretend für alle abgebildeten GC-Spektren sei hier darauf hingewiesen, daß zum Vergleich der Spektren untereinander zuerst immer auf die Intensitätsskala (Ordinate) geachtet werden muß, da die Einteilung computerbedingt sehr unterschiedlich sein kann. Zum Beispiel haben die in den Abb. 36 und 37 auftretenden Peaks bei Spec 420 ungefähr die gleiche Intensität.

Der jeweils bei Spec 420 auftretende Peak konnte als 2-Propyl-myristinsäure identifiziert werden. Da die Verbindung als Säure vorliegt, muß sie nach der Derivatisierung in die Probe gelangt sein. Wie das geschehen ist, konnte noch nicht geklärt werden. Bei den nach Spec 900 erscheinenden Peaks handelt es sich um Kohlenwasserstoffe (KW_{27-30}). Die Abbildungen zeigen, daß der Anteil an Dioctylphthalat (Spec 920) gegenüber dem bidest. Wasser von Baker auf ein Minimum reduziert werden konnte. Der hohe DOP-Gehalt im Wasser von Baker dürfte auf den Plastikeinsatz im Schraubverschluß zurückzuführen sein. Das bidest. Wasser, welches das Gaschromatogramm in Abb. 36 lieferte, wurde für alle folgenden Versuche zur Dialyse verwendet.

Bidest. Wasser, das zwei Stunden gegen das gleiche bidest. Wasser dialysiert worden war, zeigte nach Auftrennung im GC, neben den bereits erwähnten, noch zusätzliche Peaks, in der

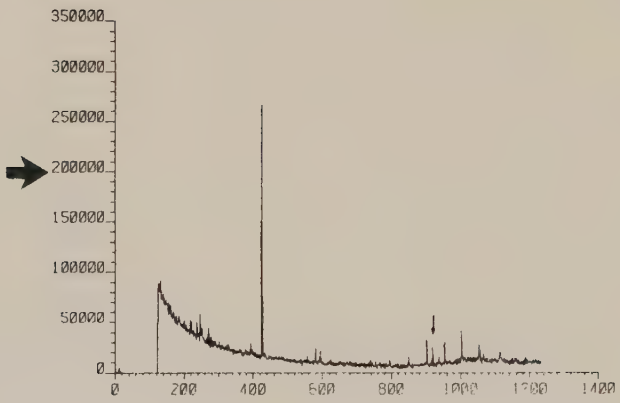


Abb. 36 Bidest. Wasser aus der Anlage
Spec 918/DOP

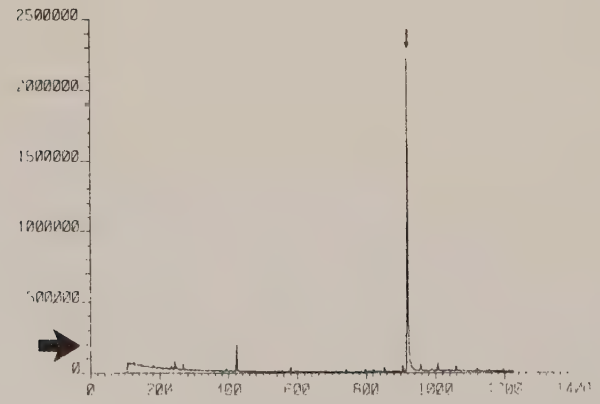


Abb. 37 Bidest. Wasser von Baker
Spec 920/DOP

Hauptsache zwischen Spec 100 und Spec 300. Außerdem traten hin und wieder Verbindungen mit Fragmentierungen auf, die den Aminosauren Pro, Phe und Tyr ähnelten, aber wesentlich andere Retentionszeiten als diese besaßen. Die meisten Komponenten dieser Probe erscheinen im Gaschromatogramm bereits mit einer Retentionszeit < 400. Das bedeutet, daß durch diese Peaks keine Störungen für den Bereich zu erwarten sind, in dem die Dipeptidpeaks auftreten (zwischen Spec 400 und 1000 in Abb. 33), vorausgesetzt, sie sind in nicht zu hoher Konzentration vorhanden. Die MS-Spektren der beiden folgenden Peaks (Spec 420 und 480) sind bekannt und können dadurch jederzeit in Gaschromatogrammen mit komplexen Dipeptidmischungen wiedererkannt werden.

6.3 Blindwerte zur Identifizierung von Substanzen aus den Enzymreinigungen und aus den Spaltansätzen

Tris, Mercaptoäthanol, Dithiothreitol und Titriplex III wurden getrennt derivatisiert (MeOH / HCl (3 N) und PFPA) in CH_2Cl_2 aufgenommen und mit GC / MS untersucht (Abb. 38-41).

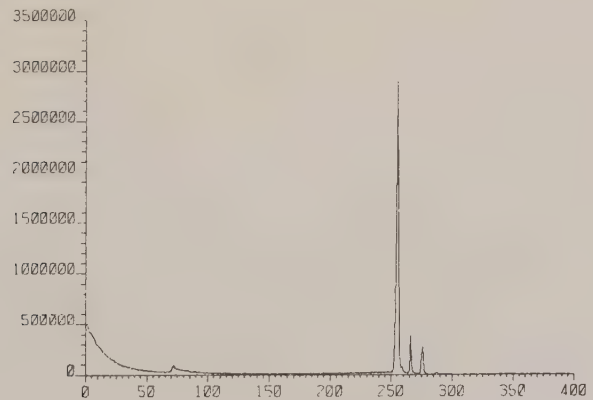


Abb. 38 Tris

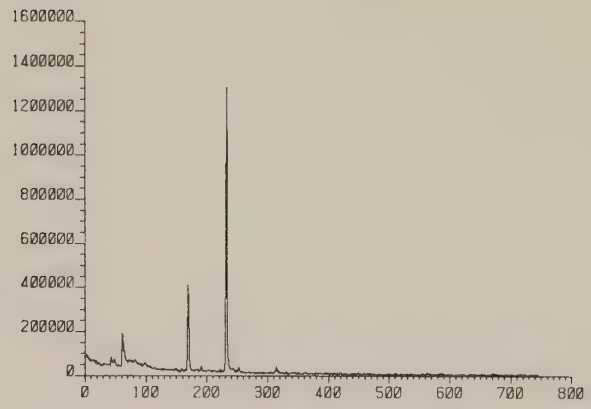


Abb. 39 Mercaptoäthanol

Abb. 40 Dithiothreitol

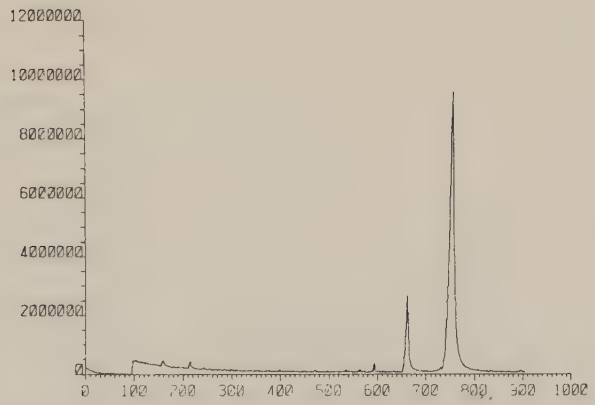


Abb. 41 Titriplex III

Da alle Peaks der Spektren von Tris, Mercaptoäthanol und Dithiothreitol vor Spec 400 kommen, ist durch diese Verbindungen ebenfalls keine Störung des Dipeptidbereiches zu erwarten. Die auf Titriplex III zurückgehenden Peaks bei Spec 660 und 750 sind bekannt und können somit bei Auftreten in den Gaschromatogrammen der späteren Spaltversuche erklärt werden.

6.4 Blindwerte mit Enzymen

Zum Nachweis gegenseitig störender Beeinflussungen der Enzyme wurden DAP I und DAP IV getrennt und in Mischung nach verschiedenenartigen Behandlungen derivatisiert und gaschromatographiert. Im einzelnen wurde jedes der beiden Enzyme getrennt dialysiert, derivatisiert (MeOH/HCl (3 N) und PFPA) und mit GC / MS untersucht. Anschließend wurden beide Enzyme, nach dem Dialysieren, einzeln und in Mischung drei Stunden in Puffer inkubiert, derivatisiert und mit GC aufgetrennt. Aus den Blindwerten ergibt sich, daß bei Inkubation von DAP I und DAP IV in Puffer bei 37° C keine Aminosäuren oder Dipeptide in nachweisbaren Mengen (GC / MS) freigesetzt werden. Außerdem läßt sich sagen, daß die störenden Nebenkomponenten aus den Enzymisolierungen durch die Dialyse weitestgehend abgetrennt worden sind. Die Gaschromatogramme zeigen im Vergleich mit denen von bidest. Wasser nach der Dialyse keine wesentliche Veränderung.

6.5 Blindwerte mit Dipeptiden

Nachdem sich gezeigt hatte, daß durch Inkubation von DAP I und IV alleine keine Bildung von Aminosäuren oder Dipeptiden in nachweisbaren Mengen erfolgt, wurde als nächstes untersucht, ob die beiden Enzyme bereits gebildete Dipeptide verändern. Für diese Versuche wurde folgende Dipeptidmischung (Mischung I) verwendet : Val-Leu, Glu-Ala, Phe-Val, Val-Tyr, Met-Pro, Thr-Phe, Ser-Leu und Asp-Pro. Zu Beginn dieser Versuchsreihe wurde die Dipeptidmischung ohne Enzyme in Puffer für 15 Stunden inkubiert (Abb. 42). Anschließend wurden die Enzyme getrennt untersucht, durch Inkubation der Mischung I mit dem jeweiligen Enzym über einen längeren Zeitraum bei 37° C (Abb. 43 und 44). Zum

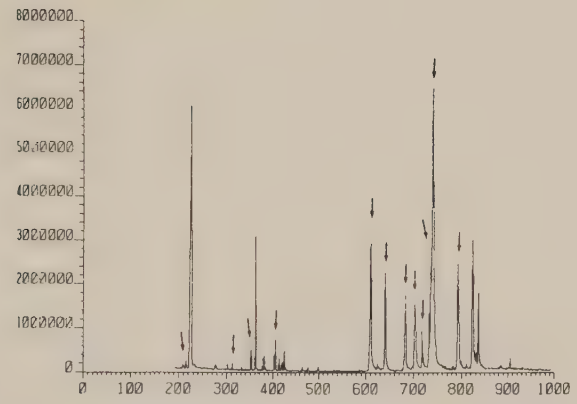


Abb. 42 GC von Mischung I (10 nMol je Dipeptid) in 25 µl Puffer, inkubiert 15 Stunden bei 37° C, derivatisiert (i.Prop. / HCl (4 N) und PFPA), aufgenommen in 10 µl CH_2Cl_2 und 2 µl injiziert (Split 1 : 5), Säule OV 1701 Spec 215/Thr, 312/Ser, 352/Pro, 405/Asp, 611/Val-Leu, 642/Ser-Leu, 682/Glu-Ala, 706/Asp-Pro, 734/Met-Pro, 738/Thr-Phe, 741/Phe-Val, 796/Val-Tyr

Nachweis der Dipeptide wurde in diesen Versuchen wie vorher mit MeOH/HCl (3 N) und PFPA derivatisiert, zur Prüfung auf Aminosäuren dagegen mit Isopropanol / HCl (4 N) (i.Prop./HCl (4 N)) und PFPA (wie in Kapitel 2.12.3 beschrieben). Mit der neuen Derivatisierung war speziell bei den Aminosäuren eine bessere Auftrennung moglich.

Bei Inkubation der Dipeptidmischung ohne Enzyme und mit Puffer über mehrere Stunden bei 37° C und anschließender Derivatisierung, können vereinzelt Dipeptide in geringen Mengen in die Aminosäuren gespalten werden (Abb. 42). Die Aminosäuren stammen ausschließlich aus Dipeptiden mit labilen Peptidbindungen (Ser-Leu, Asp-Pro, Thr-Phe). Es ist

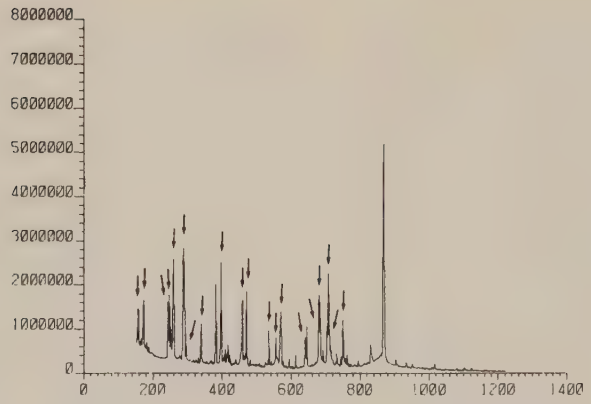


Abb. 43 Mischung I (10 nMol je Dipeptid) mit DAP I in Puffer inkubiert (16,5 Stunden) und, wie in Abb. 42 beschrieben weiterbehandelt, injiziert ohne Split, Säule CP Sil 5 Spec 157/Ala, 172/Gly, 243/Val, 247/Thr, 259/Ser, 287/Leu, 295/Ile, 339/Pro, 397/Asp, 459/Glu, 471/Phe, 535/Tyr, 555/Ser-Leu, 570/Val-Leu, 641/Glu-Ala, 680/Asp-Pro, 684/Thr-Phe, 703/Met-Pro, 708/Phe-Val, 750/Val-Tyr

möglich, daß diese Peptidbindungen unter den gewählten Veresterungsbedingungen in geringen Mengen hydrolysiert werden. Auch durch die Inkubationsbedingungen (Puffer pH 6,5 / 37° C / 15 Stunden) ist vermutlich mit einer geringfügigen Hydrolyse zu rechnen. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß die für die Mischung verwendeten Dipeptide (die zum Teil nur die Qualität reinst aufwiesen) Verunreinigungen an diesen Aminosäuren enthielten. Die angeführten Möglichkeiten wurden bisher noch nicht eingehend untersucht.

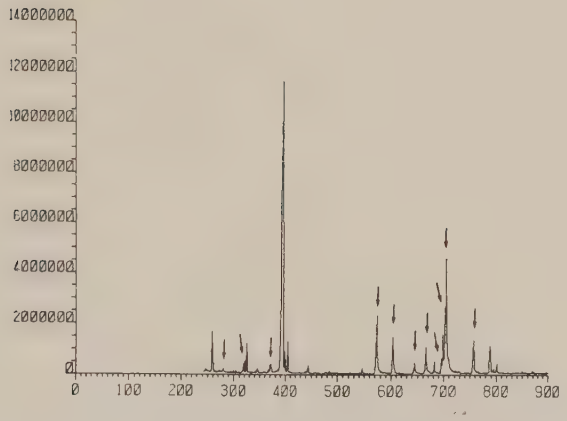


Abb. 44 Mischung I (10 nMol je Dipeptid) mit DAP IV in Puffer inkubiert (15 Stunden) und wie in Abb. 42 weiterbehandelt
Spec 280/Ser, 319/Pro, 370/Asp, 573/Val-Leu, 603/Ser-Leu, 645/Glu-Ala, 666/Asp-Pro, 697/Met-Pro, 702/Thr-Phe, 706/Phe-Val, 758/Val-Tyr

In wesentlich stärkerem Ausmaß war eine Spaltung der eingesetzten Dipeptide in die entsprechenden Aminosäuren bei zusätzlicher Inkubation mit DAP I nachweisbar (Abb. 43). Da dieser Versuch unter den gleichen Bedingungen wie den in Abb. 42 beschriebenen durchgeführt worden war, wurde auf eine Aminopeptidase-Nebenaktivität in der DAP I-Enzympräparation geschlossen.

Die Spaltung der eingesetzten Dipeptide in Aminosäuren erfolgte auch mit den verschiedenen DAP IV-Präparationen. Nur in der mit Affinitätschromatographie an Gly-pro-AH-Sepharose angereicherten DAP IV-Lösung war die Aminopeptidase-Aktivität soweit abgetrennt worden, daß selbst bei 15 Stunden Inkubation in Puffer bei 37° C und anschließender Derivatisierung (wie in Abb. 42), zu den bereits im

Blindwert vorhandenen Aminosäuren, keine neuen Aminosäuren in nachweisbaren Mengen hinzukamen (Abb. 44). Da sich dieses Verfahren bestens zum Nachweis einer Aminopeptidase-Aktivität eignet, wurde es bereits im Kapitel 3.6.1.3 zum Nachweis der vollständigen Abtrennung der Aminopeptidase-Aktivität von DAP IV herangezogen und ein Vergleich der DAP IV-Präparate verschiedener Reinigungsmethoden damit durchgeführt.

Bei den Enzymanreicherungen von DAP IV wurde nur auf Aminopeptidase-Aktivität geprüft. Aus diesem Grund wird hier ausschließlich diese Nebenaktivität als Verunreinigung diskutiert, obwohl genauso Dipeptidase-Aktivität eine Ursache des gehäuften Auftretens von Aminosäuren in Abb. 80 (Inkubation von DAP I mit Mischung I) sein kann. Inwieweit durch die bei den Enzymreinigungen verwendeten Substrate (Gly-2-NNap und Leu-2-NNap) auch Dipeptidase-Aktivität miterfaßt wurde, kann nicht gesagt werden. Der Nachweis und die Abtrennung der störenden Nebenaktivität im DAP IV-Präparat mit den genannten Substraten kann aber nachträglich als gerechtfertigt angesehen werden, da im Vergleich von Abb. 42 und 44 (Dipeptidmischung ohne und mit DAP IV inkubiert) zu den schon im Blindwert vorhandenen Aminosäuren keine neuen hinzukamen.

Aus dem Versuch mit DAP I und Mischung I (Abb. 43) ergibt sich, daß hier noch eine storende Nebenaktivität vorhanden ist, deren Abtrennung unbedingt erforderlich ist. Diese Nebenaktivität, die die nicht quantitative Abspaltung einzelner Aminosäuren bewirkt, ist als Ursache für die in den später beschriebenen Peptidspaltungen auftretenden überlappenden Spaltungen anzusehen. Deswegen wurde in den folgenden Peptidspaltungen nur auf Dipeptide geprüft und nicht auf Aminosäuren, die, durch enzymatische Spaltung mit DAP I und DAP IV, aus Peptiden, mit ungerader Zahl an Aminosäuren, entstehen.

Bei den Blindwerten mit den Dipeptiden (Mischung I) und Enzymen DAP I und DAP IV wurden stets alle eingesetzten Dipeptide gefunden und es waren keine neuen Dipeptide

nachweisbar.
Ein Vergleich der Abbildungen zeigt ferner Vorteile bei der Verwendung einer mittelpolaren Säule (OV 1701) gegenüber einer unpolaren Säule (CP Sil 5) für die Gaschromatographie. Bei der mittelpolaren Säule werden die unerwünschten Komponenten in der Hauptsache vor Spec 400 eluiert, das heißt, der Dipeptidbereich wird durch sie nicht gestört. Im Gegensatz dazu beginnt die Elution der Dipeptide von der unpolaren Säule bereits bei früheren Retentionszeiten, wodurch es zu einer teilweisen Überlappung mit den nicht vollständig abgetrennten Verunreinigungen kommt.

6.6 Peptidspaltungen und Identifizierung der Dipeptide mit HPLC, Dünnschichtchromatographie und MS

Wie in der Einleitung bereits erwähnt (Kapitel 1.3), erfolgte die Identifizierung der Dipeptide nach der Peptidspaltung mit DAP I und IV zunächst mit Säulenchromatographie und Papierchromatographie (95). Erst in späteren Jahren, mit zunehmender Entwicklung der GC / MS - Kopplung, wurde auch die GC / MS - Technik zur Identifizierung der Dipeptide eingesetzt. Die MS - Sequenzierung von Dipeptiden, nach Spaltung mit DAP, wird zum ersten Mal erwähnt bei Ovchinnikov et al. (134), Förster et al. (135) und Kelley et al. (136) in den Jahren 1972 und 1973. Die meisten Untersuchungen aus der letzten Zeit stammen von Caprioli und Seifert (7, 8, 100), sowie von Krutzsch und Pisano (9, 13, 35, 92, 93).
In den vorliegenden Untersuchungen wurden die Dipeptide der ersten mit DAP I und DAP IV durchgeführten Peptidspaltungen mit HPLC, Dünnschichtelektrophorese und MS überprüft, um die Ergebnisse mit den bereits durchgeführten und in der Literatur beschriebenen Arbeiten vergleichen zu können. Nach Spaltung der Peptide Gly-Pro-Ala, Leu-Trp-Met-Arg und Glucagon (Sequenz ist in Kapitel 6.8 Abb. 65 angegeben) erfolgte die Identifizierung der Dipeptide direkt (mit

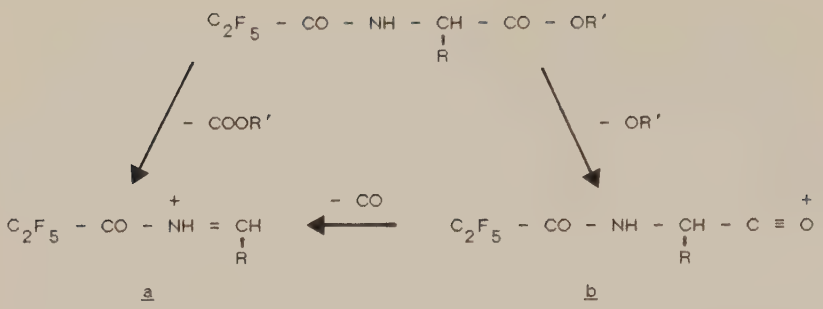
Dünnschichtelektrophorese) oder nach der Derivatisierung zu den entsprechenden Dinitrophenylverbindungen, entsprechend Kapitel 2.12.1 (mit Dünnschichtelektrophorese, HPLC und MS). Aus den Versuchen ergab sich, daß eine Identifizierung der Dipeptide nur aufgrund des gleichen R_f-Wertes der Referenzsubstanz bei der Dünnschichtelektrophorese bzw. der gleichen Retentionszeit bei der HPLC erfolgte. Dies bedeutet aber nur eine Übereinstimmung elektrophoretischer bzw. chromatographischer Eigenschaften unter definierten Bedingungen. In jedem Fall war somit eine zusätzliche Identifizierung des jeweiligen Dipeptides mit dem MS notwendig. Erst aus dem MS - Spektrum war dann der eindeutige Nachweis möglich, daß es sich um die gesuchte Verbindung handelt. Auch wenn die Aminosäurezusammensetzung eines Peptides durch eine vorherige Aminosäureanalyse bekannt ist, ist das Aufzeigen gleicher elektrophoretischer und chromatographischer Eigenschaften der Spaltprodukte im Vergleich mit einer Referenzsubstanz streng genommen kein Nachweis dafür, daß es sich wirklich um diese Verbindung handelt. Eine eindeutige Identifizierung ist in diesen Fällen nur durch Kombination mehrerer Methoden möglich. Dies führte bei den eigenen Untersuchungen zu zeit- und materialaufwendigen Versuchen, zum Beispiel : Auftrennung eines Dipeptidgemisches durch Dünnschichtelektrophorese, anschließendes Auskratzen, Eluieren und Einengen der getrennten Verbindungen und Einzelmessung mit MS. Auch in den Arbeiten von MacDonald et al. (25) und Callahan et al. (101) werden umfangreiche und zeitaufwendige Verfahren angewendet zur eindeutigen Identifizierung der Dipeptide. Die Spaltprodukte aus dem Glucagonabbau wurden dort mit Hilfe der Papierchromatographie, Säulenchromatographie und Aminosäureanalyse identifiziert. Den hohen Zeitaufwand bestätigte ebenfalls M. Hartmann in ihrer Dissertation (137), in der sie verschiedene Peptidspaltungen und die anschließende Identifizierung der Spaltprodukte mit DC, HPLC und MS beschrieb. Über den Materialaufwand im Vergleich zu den in der Literatur angegebenen Arbeiten kann nur wenig

gesagt werden, da hier keine Versuche zur Empfindlichkeit durchgeführt wurden. In jedem Fall kann aber die Aussage gemacht werden, daß durch den Nachweis der Spaltprodukte mit verschiedenen Methoden ein erhöhter Bedarf an Peptid und Enzym erforderlich ist.
Im Gegensatz dazu bietet die Derivatisierung der Dipeptide für die Gaschromatographie und die anschließende Identifizierung mit GC / MS entscheidende Vorteile, die im folgenden Kapitel beschrieben und anhand der durchgeführten Spaltungen diskutiert werden sollen.

6.7 Derivatisierung der, durch enzymatische Hydrolyse entstandenen, Spaltprodukte für die GC / MS - Analyse

6.7.1 Aminosäuren

Aminosäuren müssen für die GC - Analyse derivatisiert werden. Dazu sind mehrere Verfahren beschrieben worden, deren Gemeinsamkeit die Überführung der Aminosäuren in N-Acylaminosäureester ist : Acetyl-n-propylester (138), Trifluoracetyl(TFA)-n-propylester (139, 140), bzw. -n-butylester (141, 142) und Heptafluorbutyryl(HFB)-n-propylester (143, 144) bzw. -isobutylester (145, 146). Wir verwendeten die Perfluorpropionyl(PFP)-isopropylester, die an einer, mit OV 1701 belegten, Quarzkapillare gut getrennt werden können. Sollte auf Aminosäuren und Dipeptide aus einem Ansatz geprüft werden, arbeiteten wir mit den PFP-aminosäure-(dipeptid-)methylestern. Als Methylester wurden die perfluorpropionylierten Aminosäuren zwar nicht so gut getrennt wie die Isopropylester, die Trennung ist aber zur qualitativen Analyse hinreichend geeignet.
Die MS - Fragmentierung der Aminosäurederivate ist analog derjenigen für N-Acetylaminosäure-äthylester (147) :



Die Abspaltung der Alkoxycarbonylgruppe zum Acylimmoniumion a wird bei allen Aminosäurederivaten beobachtet. Sie führt in den meisten Fällen zu intensiven Ionen, die für die sichere Erkennung der Aminosäuren geeignet sind. Einige Aminosäuren sind durch spezifische Fragmentierungen charakterisiert : Bei Thr und Ser sind die Ionen bei m/e 188 bzw. 202 intensiv, sie entstehen aus den Ionen a durch Abspaltung von Trifluoressigsäure aus der Seitenkette. Leu und Ile können unterschieden werden, da Ile aus dem Ion a (m/e 232) bevorzugt ein Äthylradikal (→ 203) abspaltet, während bei Leu der Verlust eines Isopropylradikals (→ 190) dominiert. Bei Asp und Glu wird aus den Aminosäureseitenketten der Ionen a Methanol abgespalten, während Met durch das intensive Ion bei m/e 61 $\{CH_2^+ - S - CH_3\}$ und bei M-74 $\{CH_2 = CH - S - CH_3\}$ charakterisiert ist. Die aromatischen Aminosäuren Phe und Tyr haben a-Ionen von geringerer Intensität, da hier die durch die Wasserstoffe in Benzylstellung induzierte McLafferty-Umlagerung energetisch bevorzugt ist. Sie führt unter Verlust von Perfluorpropionylamid zu den sog. Zimtsäureionen $\{R - C_6H_4 - CH = CH - COOR\}$. Diese werden bei den Methylestern von Phe und Tyr bei m/e 162 bzw. 324 beobachtet; sie verlieren leicht ein Methoxyradikal unter Bildung der Ionen m/e 131 bzw. 293. Bei den Isopropylestern wird aus den Zimtsäureionen bei m/e 190 bzw. 352 die Abspaltung von Propen zu den Ionen bei m/e 148 bzw. 310 beobachtet. Lys ist durch ein sehr intensives Ion bei m/e 230 charakterisiert.

Tabelle 8 Massenspektren der Perfluorpropionyl-aminosäuremethylester

As	MG	M- OCH_3	M- $COOCH_3$	Aminosäure - spezifische Fragmentierungen			Basispeak
Ala	249/6	218/2	190/100				190
Asp	307/5	276/6	248/100	216/34 {248- CH_3OH}	206/74 {275- $COOCH_3$}		248
Glu	321/1	290/12	262/96	289/18 {M- CH_3OH}	230/100 {262- CH_3OH}	202/90 {230- CO}	230
Gly	235/2	204/6	176/100				176
Ile	(291)	260/1	232/58	235/48 {M- C_4H_8}	203/100 {232- C_2H_5}	190/1	203
Leu	(291)	260/1	232/64	190/40 {232- C_3H_6}	235/20	203/26	69
Lys	452/1		393/8	420/10 {M- CH_3OH}	230/100 {}[1]		230
Met	309/38	278/1	250/6	61/100 {CH_2-S-CH_3}	235/60 {M- CH_2=CH-S-CH_3}		61
Phe	325/6		266/8	162/76 {M- $C_2F_5CONH_2$}	131/22 {162- CH_3O}	91/100 {C_7H_7}	91
Pro	275/40	244/6	216/100				216
Ser	411/1	380/3	352/22	188/100 {352- C_2F_5COOH}			188
Thr	425/2	394/2	366/12	202/100 {366- C_2F_5COOH}			202
Tyr	487/1		428/10	293/32 {324- CH_3O}	324/100 {M- $C_2F_5CONH_2$}	253/88 {C_7H_6O-COC_2F_5}	324
Val	(277)		218/14				55

Die Angaben erfolgten jeweils in [m/e / rel.Int.].
Die Massen in ( ) wurden nicht beobachtet,
die unterstrichenen Massen stellen die Schlüsselbruchstücke

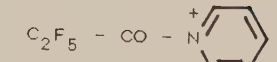
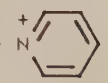
[1] $C_2F_5 - CO - N^+$ 

Tabelle 9 Massenspektren der Perfluorpropionyl-aminosäureisopropylester

As	MG	M- 86/87		M- OC_3H_7	Aminosäure - spezifische Fragmentierungen			Basispeak
Ala	(277)	190/100	191/40	218/8				190
Asp	(363)	276/22	277/20	304/4	234/90 {276- C_3H_6}	235/54 {277- C_3H_6}	262/62 {304- C_3H_6}	43
					216/26 {234- H_2O}	217/18 {235- H_2O}		
Glu	(377)	290/14	291/10	318/10	248/100 {290- C_3H_6}	230/84 {248- H_2O}	202/76 {230- CO}	248
					276/52 {318- C_3H_6}			
Gly	(263)	176/68	177/56	204/12				43
Ile	(319)	232/38	233/12	260/2	190/2 {232- C_3H_6}	203/24 {232- C_2H_5}		69
Leu	(319)	232/40	233/16	260/2	190/48 {232- C_3H_6}	203/8 {232- C_2H_5}		69
Lys	(480)				230/100 {}[1]			230
Met	337/8	250/6			221/20 {263- C_3H_6}	203/20 {263- 60}	263/12 {M- CH_3-S-CH=CH_2}	61
Phe	353/2	266/14		294/2	190/50 {M- $C_2F_5CONH_2$}	148/52 {190- C_3H_6}	91/100 {C_7H_7}	91
Pro	303/6	216/100		244/2				216
Ser	(439)	352/8		378/6	188/51 {352- C_2F_5COOH}	189/72 {352- C_2F_5COO oder $C_2F_5CONH_2$}		43
Thr	(453)	366/12		394/6	202/70 {366- C_2F_5COOH}	203/100 {366- C_2F_5COO oder $C_2F_5CONH_2$}		203
Tyr	(515)	428/28			352/80 {M- $C_2F_5CONH_2$}	310/90 {352- C_3H_6}	253/100 {C_7H_6O-COC_2F_5}	253
Val	(305)	218/78	219/20	246/4				55

Die Angaben erfolgten jeweils in [m/e / rel.Int.].
Die Massen in ( ) wurden nicht beobachtet,
die unterstrichenen Massen stellen die Schlüsselbruchstücke
zur Aminosäure-Identifizierung dar.

)[1] C_2F_5 - CO - N$^+$ 

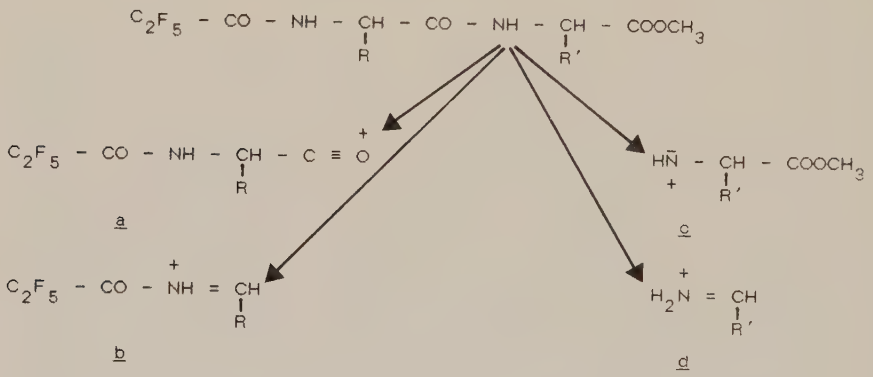
In den Tabellen 8 und 9 sind die charakteristischen Ionen zusammengefaßt und die für die Identifizierung geeigneten Ionen unterstrichen.

6.7.2 Dipeptide

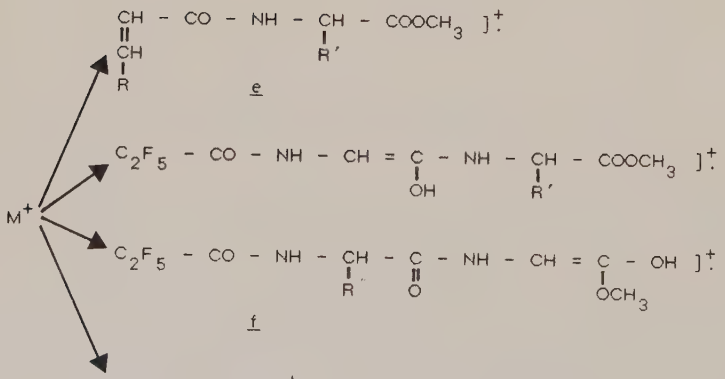
Zur massenspektrometrischen Untersuchung von Dipeptiden wurden bisher pertrimethylsilylierte Dipeptide (148), N-Ethoxycarbonylpropenyl-dipeptidmethylester (149) und Perfluoracyl-dipeptidmethylester (7, 100) eingesetzt.
Wir haben nach Vorversuchen die Methode von Caprioli und Mitarbeitern weiter ausgebaut; durch den Einsatz von Quarzkapillaren die mit mittelpolaren, chemisch vernetzten Phasen (OV 1701) belegt sind und durch ein langsames Temperaturprogramm von 2° C / Minute von 100° bis 280° C wurde die Trennung erheblich verbessert (Abb. 33).
Die Massenspektren (EI, 70 eV) der Perfluorpropionyl-dipeptidmethylester (PFP-dipeptidmethylester) eignen sich besonders gut für eine Identifizierung der Dipeptide im Nanogrammaßstab. Durch die Einführung der elektronenabziehenden PFP-Gruppe am Aminoende wird die Elektronendichte im Molekülion so auf dem Gesamtmolekül verteilt, daß man intensive Fragmente erhält, die die ***aminoständige und die carboxylständige Aminosäure zweifelsfrei charakterisieren.*** Hierbei wird ***das Molekülion zur sicheren Identifizierung nicht benötigt.*** Im Gegensatz dazu wird bei den pertrimethylsilylierten Verbindungen die Ladung im Molekülion bevorzugt auf dem Aminoende des Dipeptides lokalisiert; man erkennt sicher die aminoständige Aminosäure und muß die zweite Aminosäure des Dipeptides aus der Differenz zum Molekülion, das bei geringen Substanzmengen meistens fehlt, erschließen. Uns liegen die Massenspektren von ca. 75 % der möglichen PFP-Dipeptidmethylester als Vergleichsmaterial vor, die aus gekauften und selbst synthetisierten Dipeptiden hergestellt wurden. Eine Zusammenstellung der für die Identifizierung geeigneten Schlüsselfragmente gibt Tabelle 10.

Das folgende Schema zeigt die wichtigsten Fragmentierungstypen.

Gerüstfragmentierungen



Abspaltung von Seitenketten



(Phe, Tyr, His am NH_2-Ende)

(Ile, Leu M- 56 / Val M- 42 / Met M- 74)

(Ser, Thr)

Die Gerüstfragmentierung an der Dipeptidbindung führt unter Ladungslokalisierung auf dem Aminoende zum Acylcarboxoniumion a, das durch CO-Verlust in das Acylimmoniumion b übergeht. Ladungslokalisierung auf der Carboxylhälfte des Dipeptides liefert das Aminoesterion c bzw. das Immoniumion d. Durch diese Gerustfragmentierung können die Strukturen der meisten Dipeptidderivate erkannt werden.

Zusatzliche, für einige Aminosäuren charakteristische Fragmentierungen sichern die Strukturen : Stehen Phe, Tyr oder His am Aminoende, so wird in einer energetisch bevorzugten McLafferty - Umlagerung Perfluorpropionylamid unter Bildung der sog. "Zimtsäureionen" e (M- 163) abgespalten. Die Aminosauren Ile, Leu, Val und Met verlieren in der Regel ihre Seitenkette ebenfalls in einer McLafferty - Umlagerung unter Bildung der Ionen vom Typ f. So beobachtet man in den Spektren solcher PFP-Dipeptidmethylester Ionen bei M- 42 (Val), M- 56 (Leu, Ile) und, besonders intensive Ionen, bei M- 74 (Met); Ionen vom Typ f fragmentieren weiter unter Verlust von Methanol. Bei Anwesenheit von Thr oder Ser im Peptid werden Abspaltungen von M- 163 $\{C_2F_5COO\}$ und von M- 164 $\{C_2F_5COOH\}$ beobachtet.

Beim heutigen Entwicklungsstand in der Routine von Bibliothekssuchen ist die automatische Identifizierung eines unbekannten PFP-Dipeptidmethylesters durch Bibliotheksvergleich ohne weiteres möglich.

Tabelle 10 Schlüsselfragmente für die Identifizierung von PFP-Dipeptidmethylestern

As	N - terminal	C - terminal	Seitenkette
Ala	190, 191	44, 102 127, 156	
Asn	215		
Asp	189, 216, 217, 248, 249	70, 102, 128, 160, 162	M- 32
Gln	190, 202, 229, 230	143, 144	
Glu	202, 203, 230, 231, 262, 263	84, 116, 144	M- 32
Gly	176, 177	90	
His	81, 110, 120, 121, 256, 284	81, 110, 121, 136, 152, 168, 196	M- 81
Hyp	214, 215, 406	68, 69, 126, 127, 232, 233, 290	
Ile	69, 204, 232, 233	86, 128, 144	M- 56
Leu	190, 218, 232, 233	86, 144, 172	M- 56
Lys	230, 393, 394	230, 247, 305	M-230
Met	61, 250, 278	61, 88, 89, 104, 162	M- 74
Phe	91, 103, 131, 266, 267	91, 120, 131, 162	M- 91
Pro	216, 217	70, 128, 129	
Ser	188, 189	102, 176, 206, 265, 266	M-164
Thr	202, 203	56, 220, 278	M-164
Tyr	253, 293, 427, 428	253, 282, 293, 324	M-253
Val	55, 176, 204, 218, 219	72, 130, 131	M- 42

Die unterstrichenen Zahlen geben die Ionen an, die als intensivste Peaks auftreten.

6.8 Peptidspaltungen und Identifizierung der Dipeptide mit GC / MS

In den folgenden Versuchen wurden die durch enzymatische Spaltung entstandenen Dipeptide ausschließlich mit GC / MS identifiziert. Diese Methode ist gegenüber denen, die im vorherigen Kapitel angegeben sind, wesentlich zeitsparender, da die im GC aufgetrennten Spaltprodukte sofort mit Hilfe des gekoppelten MS identifiziert werden können. Dies bedeutet, daß *Trennung und Identifizierung der Komponenten eines Dipeptidgemisches in einem Arbeitsgang* erfolgen. Ferner besteht die Möglichkeit, dieses Verfahren zu automatisieren und durch ein Computerprogramm die aufgenommenen Spektren mit einer Bibliothek von Referenzspektren zu vergleichen.
Die folgenden Abb. (45 - 66) zeigen die Ergebnisse der durchgeführten Peptidspaltungen. Wegen der im wesentlichen übereinstimmenden Versuchsdurchführung (siehe auch Kapitel 2.8 / 2.11 / 2.12) kann eine für alle Spaltungen geltende Arbeitsweise vorangestellt werden. Die Aminosäureanalyse der für die folgenden Versuche verwendeten Modellpeptide war in allen Fällen bereits bekannt. Zwischen 6 und 70 nMol Peptid (in der Legende zu jeder Abb. genau angegeben) wurden mit jeweils 0,2 Unit dialysiertem DAP I und DAP IV in 25 µl Puffer ca. vier Stunden bei 37° C inkubiert. Die gaschromatographische Auftrennung der zu PFP-Dipeptid-(Aminosäure-)-methylestern derivatisierten und in 10 µl CH_2Cl_2 gelösten Dipeptide erfolgte durch injizieren von 2 µl Probenlösung. Die verwendete Säule war eine mit OV 1701 belegte Quarzkapillare. Anschließend wurden die getrennten Verbindungen mit Hilfe des gekoppelten MS identifiziert.

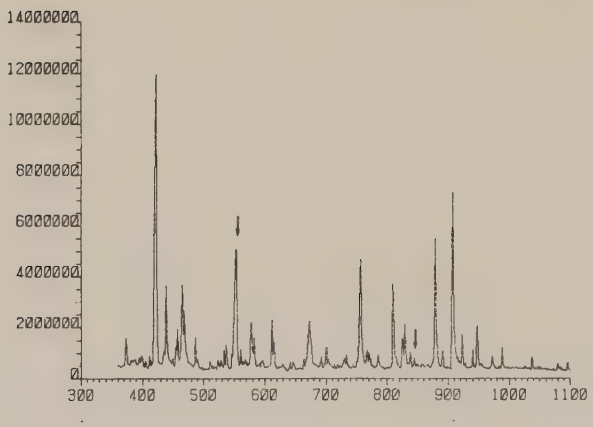


Abb. 45 GC von Gly-Leu-Tyr (20 nMol)
Spec 553/Gly-Leu, 844/Leu-Tyr

Nach der enzymatischen Spaltung von Gly-Leu-Tyr konnten mit GC / MS die Dipeptide Gly-Leu und Leu-Tyr identifiziert werden (Abb. 45). Das Auftreten zweier überlappender Dipeptide nach Spaltung eines Tripeptides deutet wieder auf eine Nebenaktivität im Enzymgemisch hin (wie bereits unter 6.5 erwähnt). Mit Sicherheit ist die im DAP I-Präparat vorhandene Aminopeptidase-Nebenaktivität dafür verantwortlich zu machen. Aus dem sehr unterschiedlichen Intensitätsverhältnis der beiden Dipeptidpeaks kann, unter Vorbehalt (siehe Diskussion zu Abb. 62), darauf geschlossen werden, daß das Tripeptid für die Aminopeptidase ein weniger geeignetes Substrat ist als für DAP I. Trotz der sehr geringen Intensität des Leu-Tyr-Peaks ist aus dem Massenspektrum eine eindeutige Identifizierung möglich (Abb. 46).

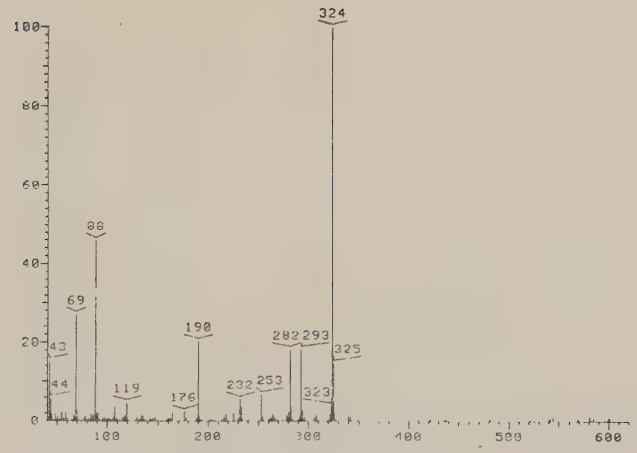


Abb. 46 Massenspektrum von PFP-Leu-Tyr-methylester

Dies ist ein Beweis dafür, daß eine eindeutige massenspektrometrische Identifizierung eines GC-Peaks unabhängig von seiner Intensität erfolgen kann, vorausgesetzt, der Peak hebt sich noch sichtbar vom Untergrund ab. Das Dipeptid Leu-Tyr ist an folgenden Peaks im MS zu erkennen : Basispeak bzw. C-terminales Sequenzion m/e 324 und N-terminales Sequenzion m/e 232 zeigen bereits eindeutig an, daß die Sequenz Leu-Tyr vorliegt. Zusätzliche Hinweise auf diese Sequenz erhält man aus dem Vorhandensein des Ions m/e 190, das für aminoendständiges Leu charakteristisch ist und gleichzeitig Ile ausschließt. Die Ionen m/e 293 und m/e 253 sind für Tyr charakteristisch. Der verstärkte Untergrund im Vergleich zu den Blindwerten ist wahrscheinlich auf Verunreinigungen des Ausgangspeptides zurückzuführen. Die zur Spaltung verwendeten Peptide waren von unterschiedlichster Reinheit.

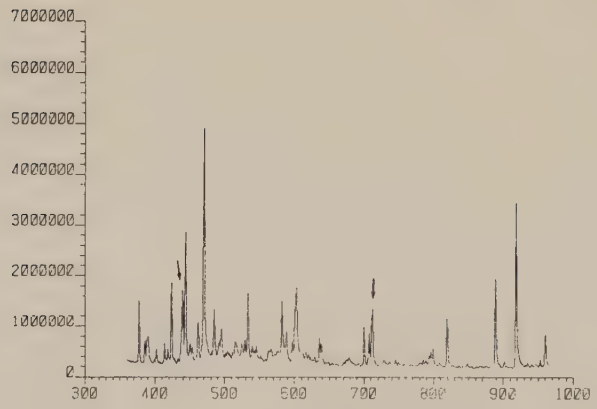


Abb. 47 GC von Gly-Ala-Phe (20 nMol)
Spec 439/Gly-Ala, 712/Ala-Phe

Die Spaltung von Gly-Ala-Phe mit den beiden Enzymen DAP I und IV führt wiederum zur Bildung zweier überlappender Dipeptide (Abb. 47). Da die Aminosaurezusammensetzung als bekannt voausgesetzt werden kann, ist in diesem Fall sogar die eindeutige Sequenzierung eines Tripeptides mit nur einem Schritt möglich. Aus der Aminosäureanalyse weiß man, daß die im Peptid vorkommenden Aminosäuren im gleichen Verhältnis zueinander vorliegen und aus der GC / MS - Analyse erfährt man, daß wegen der beiden entstandenen Dipeptide Gly-Ala und Ala-Phe nur das Tripeptid Gly-Ala-Phe das Ausgangspeptid gewesen sein kann. In Fällen besonders kurzer, hydrophober Peptide (Tripeptide bis Pentapeptide) kann es bei der automatischen Sequenzierung mit einem Aminosäuresequenator bei den einzelnen Reaktionsschritten leicht zum Auswaschen des Peptides aus dem Reaktionsgefaß kommen, weswegen in der Regel größere Peptidkonzentrationen verwendet werden als zur Sequenzierung längerer Peptide. In diesem Größenbereich von Peptiden ist dagegen in der GC / MS - Identifizierung eine Steigerung der Empfindlichkeit möglich, da ein Überlappen der Dipeptidpeaks sehr unwahrscheinlich ist.

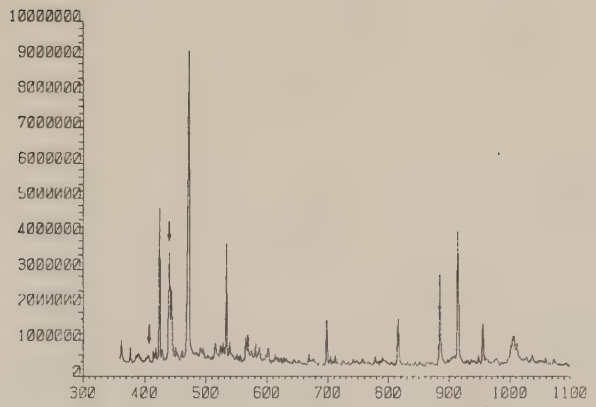


Abb. 48 GC von Gly-Ala-Gly (20 nMol)
Spec 406/Ala-Gly, 440/Gly-Ala

Am Beispiel der Spaltung von Gly-Ala-Gly (Abb. 48) ist zu sehen, daß die Identifizierung mit GC / MS - Kopplung eine eindeutige Aussage über die jeweils amino- bzw. carboxylständige Aminosäure ermöglicht. Wie aus den Abb. 49 und 50 zu sehen ist, unterscheiden sich die Massenspektren von Ala-Gly und Gly-Ala deutlich.
Das Spaktrum von PFP-Ala-Gly-methylester ist durch das Sequenzion m/e 190/191 des aminoständigen Ala charakterisiert. Dieses Ion fehlt im Spektrum des Gly-Ala-Derivates; hier ist das aminoendständige Gly durch das Signal bei m/e 176/177 angezeigt. In diesem Spektrum beobachtet man, wie zu erwarten, die für das carboxylständige Ala kennzeichnenden Ionen bei m/e 102 und 44. Diese fehlen wiederum im Spektrum des Ala-Gly-Derivates.

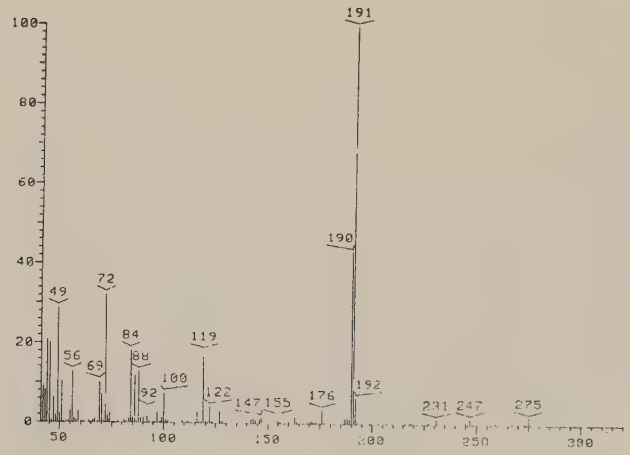


Abb. 49 Massenspektrum von PFP-Ala-Gly-methylester

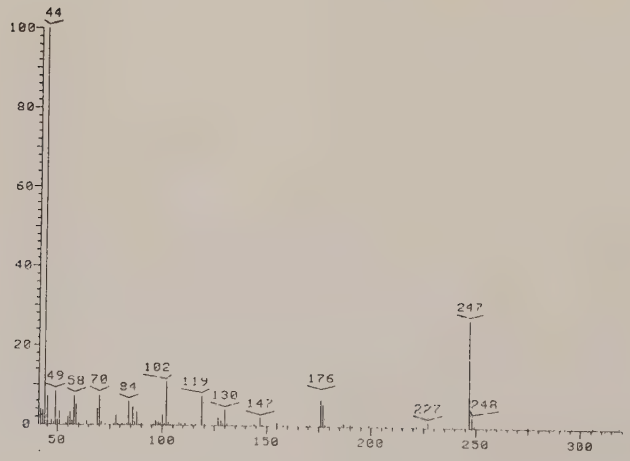


Abb. 50 Massenspektrum von PFP-Gly-Ala-methylester

Das Tripeptid Leu-Gly-Phe (20 nMol), mit DAP I und IV gespalten, liefert als Ergebnis die Dipeptide Leu-Gly und Gly-Phe. Unter den am Anfang dieses Kapitels gegebenen Beschreibungen, zur Durchführung dieser Peptidspaltungen, wurde erwähnt, daß von der eingesetzten Peptidmenge, die nach der Derivatisierung in 10 µl CH_2Cl_2 gelöst werden, nur 2 µl injiziert werden. Das bedeutet für die bisher beschriebenen Versuche, daß nur 4 nMol Peptid injiziert und auf der Säule aufgetrennt wurden.

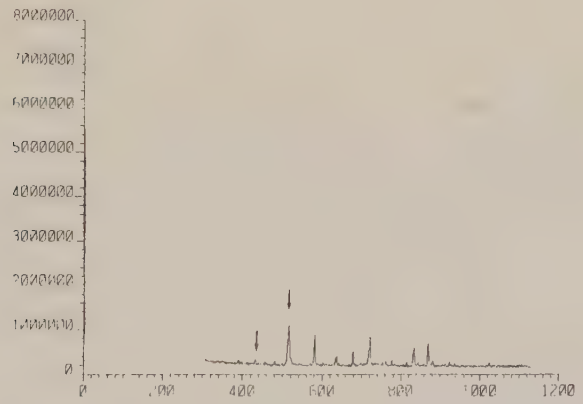


Abb. 51 GC von Gly-Pro-Ala (10 nMol)
nur mit DAP IV gespalten
Spec 432/Pro-Ala, 516/Gly-Pro

In diesem Beispiel wurden nur 10 nMol Gly-Pro-Ala eingesetzt und mit DAP IV alleine gespalten, das heißt, der Nachweis erfolgte mit 2 nMol Peptid. Im Vergleich zu den vorhergehenden Spektren ist der Untergrund hier wesentlich geringer, was zum einen durch eine höhere Reinheit des Ausgangspeptides verursacht sein kann, zum anderen durch die Verwendung nur eines Enzyms. Das Auftreten von Pro-Ala als Dipeptid ist vermutlich eher darauf zurückzuführen, daß davon Spuren im Ausgangspeptid vorhanden sind, als auf eine Aminopeptidase-Nebenaktivität, die, wie in Kapitel 6.5 beschrieben,

vollständig abgetrennt worden war. Es ist aber auch möglich, daß das Tripeptid bereits durch dreistündige Inkubation im Puffer pH 6,5 geringfügig gespalten wird. Der Nachweis dafür könnte mit dem Ausgangspeptid geführt werden, indem es ohne Spaltung inkubiert und anschließend derivatisiert und mit GC / MS gemessen wird.

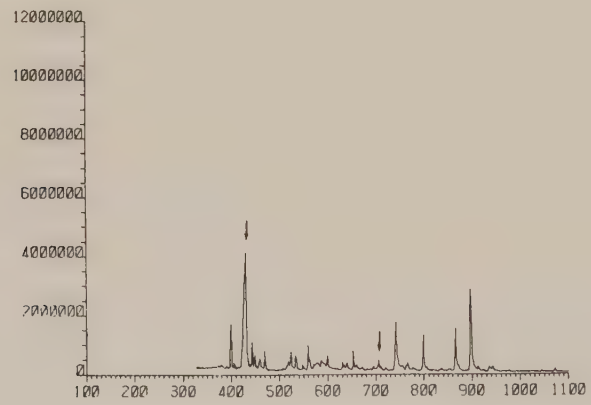


Abb. 52 GC von Val-Gly-Ser-Glu (20 nMol)
Spec 430/Val-Gly, 706/Ser-Glu

Aus dem Ergebnis der Spaltung von Val-Gly-Ser-Glu (Abb. 52) ergibt sich ein anderes Problem. Mit Hilfe der hier angewendeten Derivatisierung (MeOH / HCl (3 N) und PFPA) ist keine Unterscheidung zwischen Glu und Gln möglich (das gleiche gilt für Asp und Asn). Erhält man aus der Aminosäureanalyse für Asp oder Glu einen Peak, so sollte nach der enzymatischen Spaltung des Peptides anders derivatisiert werden : Zuerst mit PFPA versetzen, dann mit Diazomethan (CH_2N_2) reagieren lassen (15 Minuten bei Raumtemperatur). Unter diesen Bedingungen bleibt die Amidbindung in Asn und Gln erhalten und wird nicht, wie in der sonstigen Derivatisierung (MeOH / HCl und anschließend PFPA) hydrolisiert. In diesem Beispiel sind keine überlappenden Dipeptide entstanden. Es wäre jedoch nach

einer weiteren Spaltung, des durch Edmanabbau um eine Aminosäure verkürzten Peptides und der Information aus der Aminosäureanalyse, die Peptidsequenz bestimmbar.

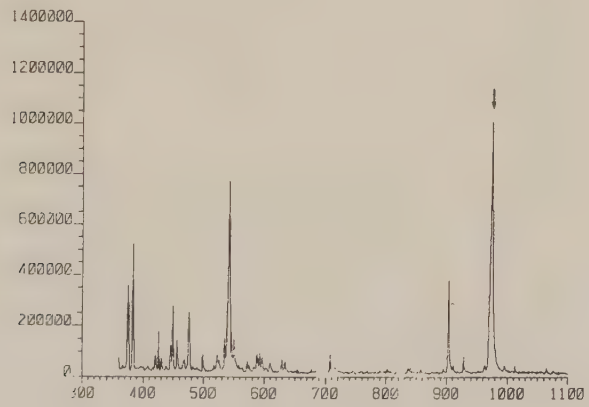


Abb. 53 GC von Ala-His-Gly-Lys (50 nMol) derivatisiert mit MeOH / HCl (0,5 N) und PFPA Spec 976/Gly-Lys

Das Gaschromatogramm der Dipeptide nach der Sequenzierung von Ala-His-Gly-Lys (Abb. 53) zeigt die Schwierigkeit mit Dipeptiden, die His enthalten. Bei den bisherigen Versuchen mit His-haltigen Peptiden nach Derivatisierung mit MeOH / HCl (3 N) und PFPA wurden keine Dipeptide mit His gefunden. Dipeptide mit His werden entweder bei der Derivatisierung schon zum Teil zersetzt oder sie können nicht unzersetzt über die Säule chromatographiert werden. Nach Derivatisierung mit 0,5 N HCl gelang dagegen in manchen Fällen der Nachweis von His-haltigen Spaltprodukten. Im vorliegenden Beispiel wurde trotz der milderen Derivatisierungsbedingungen, höheren Peptidkonzentration und größeren Intensität durch computerbedingte Änderung der Ordinate kein Dipeptid mit His gefunden, sondern nur Gly-Lys als Spaltprodukt. Die eindeutige Identifizierung von Dipeptiden, die His enthalten, wird in der Diskussion zu Abb. 56 erläutert.

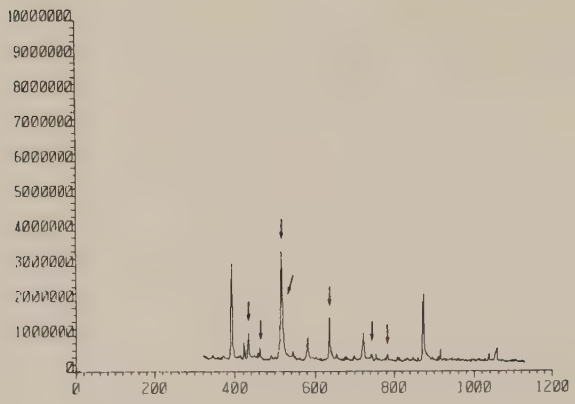


Abb. 54 . GC von Leu-Leu-Val-Tyr / Gly-Phe-Ala-Ala und Gly-Pro-Ala (je 10 nMol)
Spec 433/Pro-Ala, 462/Leu-Val, 512/Gly-Pro, 521/Leu-Leu, 637/Phe-Ala, 742/Gly-Phe, 783/Val-Tyr

Für den in Abb. 54 gezeigten Versuch wurden drei Peptide mit DAP I und DAP IV gespalten, um Kenntnis darüber zu erhalten, wie die Dipeptidverteilung oder eventuelle Uberlappung der Dipeptide im Gaschromatogramm nach Spaltung längerer Peptide sein würde. Bei der Spaltung entstehen wiederum, wie schon in früheren Beispielen, alle theoretisch möglichen Dipeptide. Der Untergrund im Bereich der Retentionszeit 400 - 1000 ist klein und die Dipeptidpeaks sind in diesem Teil somit gut sichtbar. Nur zwei Dipeptidpeaks überlappen sich, Gly-Pro und Leu-Leu. Durch Spreizung der Abszisse in diesem Bereich ist aber deutlich eine Schulter in dem Peak erkennbar, die auf ein zweites Dipeptid schließen läßt. Nach Subtraktion des Spektrums von Gly-Pro, von dem in der Schulter aufgenommenen Spektrum, ist auch hier die eindeutige Identifizierung von Leu-Leu moglich.

Aus dem Spaltversuch von Tyr-D-Met-Gly-Phe-Pro-amid (50 nMol) erhält man nach Derivatisierung und Auftrennung im Gaschromatogramm keine Dipeptide. Dieses Ergebnis ist eine Bestätigung dafür, daß Peptide mit einer D-Aminosäure an zweiter Stelle vom Aminoende her gesehen für die Enzyme DAP I und IV keine Substrate darstellen und infolgedessen nicht angegriffen werden (siehe auch Einleitung, Kapitel 1.2.1 und 1.2.2).

Wie schon in der Diskussion zu Abb. 53 erörtert, wurde auch im Spaltbeispiel von His-Leu-Asp-Asn-Leu-Lys nach der GC / MS - Identifizierung kein His-haltiges Dipeptid gefunden, sondern nur Asp-Asp und Leu-Lys. Weiterhin zeigt dieser Versuch erneut, daß bei der hier üblicherweise verwendeten Derivatisierung (MeOH / HCl und PFPA) keine Unterscheidung zwischen Asp und Asn möglich ist (siehe auch Diskussion zu Abb. 52). Für die wirkliche Sequenz würden demnach folgende vier Möglichkeiten bestehen : Asp-Asp, Asp-Asn, Asn-Asp und Asn-Asn. Nach der Derivatisierung mit PFPA und CH_2N_2 kann Asp-Asn als zutreffende Sequenz identifiziert werden. Eine Unterscheidung der vier Dipeptide ist wiederum durch Vergleich der Sequenzionen möglich. Die Dipeptide mit Asp besitzen charakteristische Ionen, die aus Asn nicht gebildet werden. Bei N-terminalem Asp tritt das Ion m/e 248/249 auf und bei C-terminalem Asp werden die Ionen m/e 160 und m/e 102 gefunden.

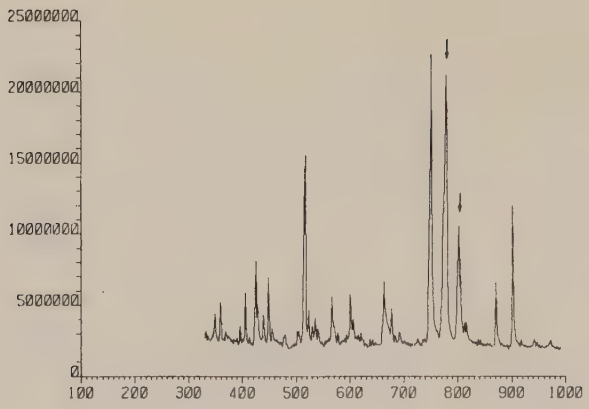


Abb. 55 GC von Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Lys (50 nMol)
Spec 776/Gly-Phe, 805/Tyr-Gly

Das Gaschromatogramm der derivatisierten Spaltprodukte von dem Peptid Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Lys liefert das gleiche Ergebnis wie von dem Peptid mit carboxylständigem Phe an Stelle von Lys. Es konnten hier nur Tyr-Gly und Gly-Phe als Spaltprodukte nachgewiesen werden. Bei einer Derivatisierung mit MeOH / HCl und PFPA sind Arg-haltige Peptide mit GC / MS nicht nachweisbar, da sie in nicht ausreichend flüchtige Verbindungen überführt werden. Der Nachweis von Dipeptiden mit Arg ist jedoch mit FAB-MS möglich, da bei dieser Methode die Dipeptide bzw. Restpeptide ohne vorherige Derivatisierung gemessen und identifiziert werden können. Mit dem in Abb. 55 gezeigten Peptid wurde nach Spaltung mit DAP I auch eine Sequenzbestimmung mit FAB-MS durchgeführt (siehe Kapitel 6.12).

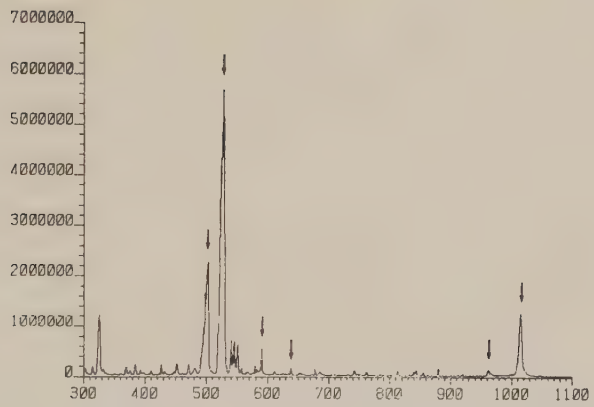


Abb. 56 GC von Val-His-Leu-Thr-Asp-Ala-Glu-Lys (50 nMol), verestert mit MeOH / HCl (0,5 N) Spec 500/Asp-Ala, 528/Leu-Thr, 590/Thr-Asp 638/Ala-Glu, 962/Val-His, 1016/Glu-Lys

Für Abb. 56 wurde ein Oktapeptid gespalten, das als Ergebnis alle der Reihe nach abgespaltenen Dipeptide lieferte (Val-His, Leu-Thr, Asp-Ala und Glu-Lys). Auf die abgeänderte Derivatisierung zur Unterscheidung von Asp / Asn und Glu / Gln wurde bereits bei früheren Abb. hingewiesen. Bei diesem Versuch gelang auch der Nachweis eines His-enthaltenden Dipeptides. Trotz der sehr geringen Intensität des Val-His-Peaks war mit einem hiervon aufgenommenen Massenspektrum (Abb. 57) die Identifizierung zweifelsfrei durchführbar.

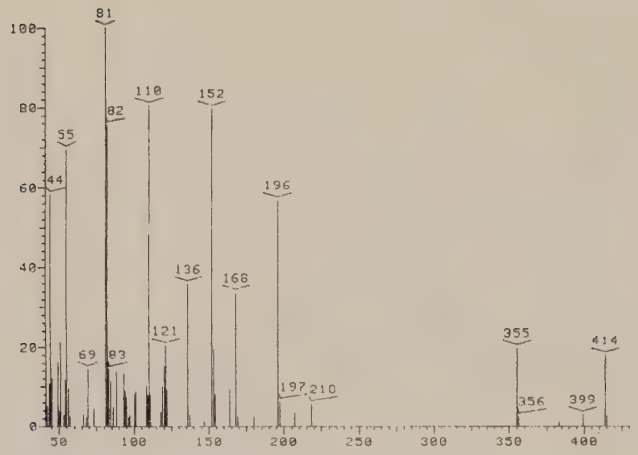


Abb. 57 Massenspektrum von PFP-Val-His-methylester

Die charakteristischen Ionen für His am Carboxylende des Dipeptides sind : m/e 152 und 120/121, die Ionen m/e 196, 168 und 136 stützen diese Interpretation. Bei Dipeptiden mit His ist die positive Ladung im Molekülion weitgehend auf dem His-Anteil lokalisiert, deshalb besitzen die Sequenzionen der zweiten Aminosäure (hier Val m/e 218) nur geringe Intensität. Aus diesem Grund erleichtern His-enthaltende Dipeptide auch die Identifizierung des Molekülions, durch Auftreten intensiver Ionen bei M- 59 {- CO - OCH_3}.

Die Tatsache, daß Thr-Asp als erstes überlappendes Dipeptid in der Peptidsequenz auftritt, könnte wie folgt erklärt werden : Die als Verunreinigung im DAP I-Präparat enthaltene Aminopeptidase-Aktivität hat ihre größte Aktivität gegenüber Peptiden, die Leu am Aminoende enthalten (Leucin-Aminopeptidase) und geringere Spezifität gegenüber anderen Peptiden. Das Ausgangspeptid wäre somit für die Aminopeptidase nur ein schlechtes Substrat. Nach Abspaltung des ersten Dipeptides steht nun Leu am Aminoende und die Aminopeptidase kann jetzt in Konkurrenz zur DAP I treten. Durch Abspaltung von Leu alleine kommt es dann zur überlappenden Spaltung. Diese

Betrachtungsweise gibt auch eine mögliche Erklärung dafür, daß bei den gespaltenen Peptiden Leu-Gly-Phe und Leu-Leu-Val-Tyr (Abb. 54) überlappende Dipeptide im Gaschromatogramm auftreten, dagegen bei den Peptiden Val-Gly-Ser-Glu (Abb. 52), His-Leu-Asp-Asn-Leu-Lys und Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Lys (Abb. 55) nicht. Bei den letzteren befindet sich Leu entweder an gerader Stelle innerhalb des Peptides und ist deshalb für die Aminopeptidase nicht ohne weiteres erreichbar oder an vorletzter Stelle vor dem Caboxylende, weswegen keine überlappenden Dipeptide mehr entstehen können.

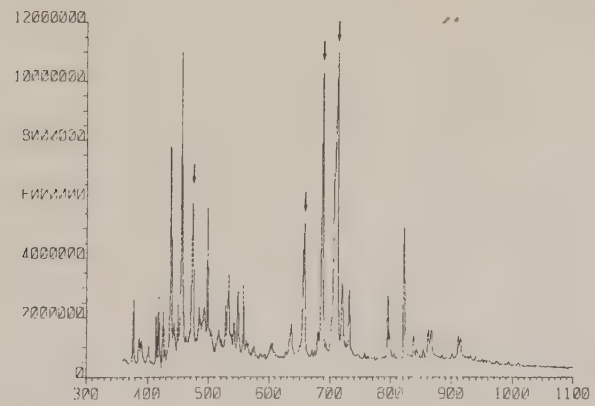


Abb. 58 GC von Gly-Glu-Gly-Phe-Leu-Gly-D-Phe-Leu (50 nMol)
Spec 473/Leu-Gly, 656/Gly-Glu, 688/Phe-Leu, 708/Gly-Phe

Das in Abb. 58 untersuchte Peptid enthält an siebenter Stelle eine D-Aminosäure. Entsprechend den Angaben in Kapitel 1.2.1 ist DAP I auch dann in der Lage, eine Peptidbindung zu spalten, wenn die Aminosäure, die die Aminogruppe in die Peptidbindung einbringt, in der D-Konfiguration vorliegt. Im Gegensatz dazu erfolgt keine

Spaltung, wenn die Aminosäure, die die Carboxylgruppe in die Peptidbindung einbringt, D-Konfiguration besitzt (siehe S. 127). Überlappende Spaltung durch Aminopeptidase könnte zwar auch bei dem in Abb. 58 angegebenen Peptid erfolgen, da Leu an ungerader Stelle innerhalb des Peptides auftritt und somit nach Abspaltung von Gly-Glu und Gly-Phe für die Aminopeptidase zugänglich wäre, aber das dadurch entstehende Peptid (Gly-D-Phe-Leu) ist wegen der D-Aminosäure an zweiter Stelle kein Substrat für DAP I. Die Dipeptide können trotz des relativ hohen Untergrundes im vorliegenden Gaschromatogramm eindeutig vom Untergrund unterschieden werden, da zum einen ca. 75 % aller Dipeptidspektren als Referenzen vorhanden sind (W. Schäfer, E. Brose unveröffentlicht) und zum anderen die Dipeptide aufgrund ihrer Schlüsselfragmente eindeutig identifiziert werden können.

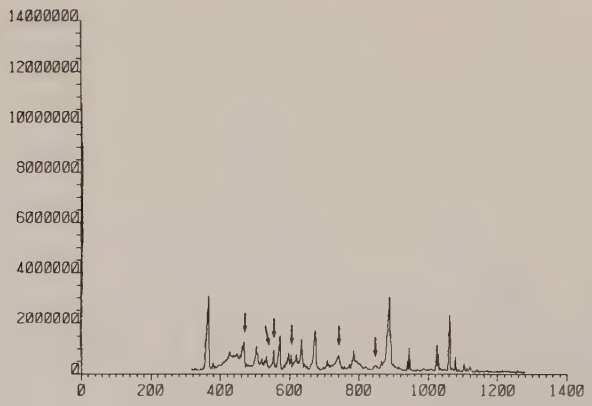


Abb. 59 GC von Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu (50 nMol)
Spec 467/Ala-Gly, 553/Asp-Ala und Ala-Ser, 604/Ser-Gly, 741/Gly-Asp, 845/Gly-Glu

Nach der Spaltung von Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu konnten alle nacheinander abgespaltenen Dipeptide mit GC / MS identifiziert werden : Ala-Gly, Gly-Asp, Ala-Ser, Gly-Glu. Daneben traten auch zwei der drei möglichen überlappenden Dipeptide auf, nämlich Asp-Ala und Ser-Gly. Auf die abgeänderte Derivatisierung zur Identifizierung von Asp / Asn und Glu / Gln wurde bereits in Diskussionen zu vorausgehenden Abbildungen eingegangen.

Die Spaltung von Tyr-Ser-Met-Glu(OBut.)-His-Phe-Arg-Trp-Gly (50 nMol) zeigt, daß auch Peptide mit veresterter Glu von der Enzymmischung in Dipeptide gespalten werden. In diesem Versuch ist der Nachweis von Glu mit der gängigen Derivatisierungsmethode möglich, da bekannt war, daß die Seitenkette von Glu mit Butanol verestert ist. Mit GC / MS wurden die Dipeptide Tyr-Ser und Met-Glu(OBut.) identifiziert. Das Dipeptid His-Phe wurde wiederum nicht gefunden. Der Nachweis von Arg-Trp kann nicht erfolgen, da Arg-Peptide nach dieser Derivatisierung nicht ausreichend flüchtig sind und Trp unter den angewandten Veresterungsbedingungen (MeOH / HCl (3N)) hydrolisiert wird. Zum Nachweis von Trp-haltigen Dipeptiden wurden bisher noch keine Versuche unternommen.

Das Decapeptid Val-Leu-Asn-Ser-Phe-Ser-Glu-Gly-Leu-Lys (40 nMol) ergibt nach der Versuchsdurchführung alle und nur die Dipeptide, die aufgrund einer Spaltung mit gereinigten Enzymen DAP I und IV zu erwarten sind, nämlich : Val-Leu, Asp-Ser, Phe-Ser, Glu-Gly und Leu-Lys. Das Beispiel belegt somit, daß die in DAP I enthaltene Nebenaktivität nicht unspezifisch aus Peptiden N-terminal Aminosäuren abspaltet, sondern nur, wenn die bei der Dipeptidspaltung auftretenden Restpeptide geeignete Substrate darstellen.

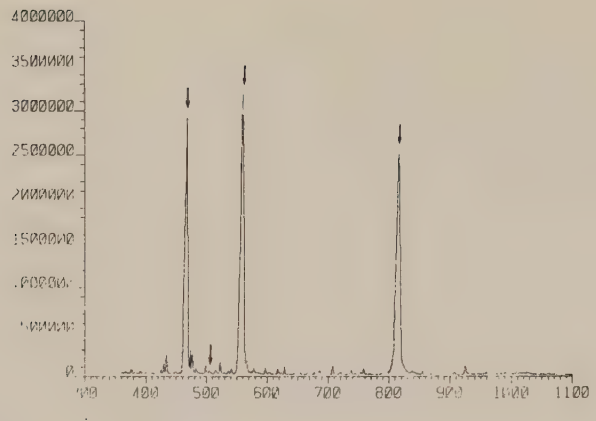


Abb. 60 GC von Leu-Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg (40 nMol) verestert mit MeOH / HCl (0,5 N)
Spec 467/Val-Val, 504/Leu-Val, 556/Leu-Leu, 816/Tyr-Pro

Im Versuch der Abb. 60 ist wegen des sehr niederen Untergrundes im Gaschromatogramm selbst noch das überlappende Dipeptid Leu-Val identifizierbar, obwohl der entsprechende Peak sich nur minimal aus dem Untergrund abhebt (Abb. 61).
Die charakteristischen Ionen für dieses Dipeptid sind im Massenspektrum deutlich zu erkennen : Sequenzion für aminoendständiges Leu ist m/e 233. Das carboxylständige Val ist durch Ionen bei m/e 130 und 72 charakterisiert. Das Ion bei m/e 190 erlaubt die Unterscheidung zwischen Leu und Ile: Im PFP-Ile-Val-methylester wäre ein Ion bei m/e 204 {233-C_2H_5} zu erwarten. Dieses Beispiel gibt auch einen Hinweis darauf, daß das Dipeptid Leu-Val möglicherweise durch überlappende Spaltung entstanden ist, da dessen Peakintensität sich wesentlich von den Intensitäten der drei anderen Dipeptidpeaks unterscheidet. So kann der bisher als Nachteil betrachtete Effekt der überlappenden Spaltung als zusätzliche Information zur Sequenzbestimmung angesehen

werden. Ein weiterer Spaltversuch nach einem vorausgehenden Edmanabbau würde dann das Dipeptid Leu-Val im Gaschromatogramm mit verstärkter Peakintensität enthalten.

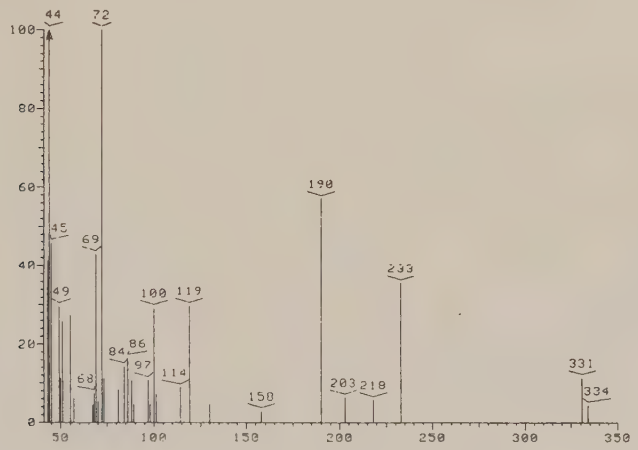


Abb. 61 Massenspektrum von PFP-Leu-Val-methylester

Auch bei der enzymatischen Spaltung von Val-Val-Ala-Gly-Val-Ala-Thr-Ala-Leu-Ala-Lys (50 nMol) kommt es nicht zur Bildung überlappender Dipeptide. Die Identifizierung der C-terminalen Aminosäure Lys wäre in diesem Beispiel sicher ohne weiteres möglich gewesen. Da es hier nicht zur überlappenden Spaltung kam, kann davon ausgegangen werden, daß keine einzelne Aminosäuren aus den Restpeptiden abgespalten wurden. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß bereits entstandene Dipeptide in kleinen Mengen weitergespalten werden, was eine Erschwerung der Identifizierung der carboxlständigen Aminosäure Lys bedeuten würde.

Die enzymatische Spaltung des Peptides Val-Asn-Val-Asp-Glu-Ile-Gly-Gly-Glu-Ala-Leu-Gly-Arg (ca. 70 nMol) ergab nach der GC / MS -Identifizierung die Dipeptide Val-Asn, Val-Asp, Glu-Ile und Ile-Gly, die anderen möglichen Dipeptide wurden nicht gefunden. Bei diesem Versuch war die eingesetzte Peptidmenge nicht genau bekannt, deswegen wurde das ganze Material eingesetzt. Die Sequenz sollte erneut untersucht werden, sobald das Peptid wieder zur Verfügung steht.
Wie bereits mehrmals in vorausgehenden Diskussionen erläutert, unterscheiden sich Val-Asp und Val-Asn dadurch, daß im ersteren die Ionen m/e 102 und 160 auftreten, bei Val-Asn dagegen nicht. Diese charakteristischen Ionen erlauben somit eine eindeutige Unterscheidung der beiden Dipeptide.

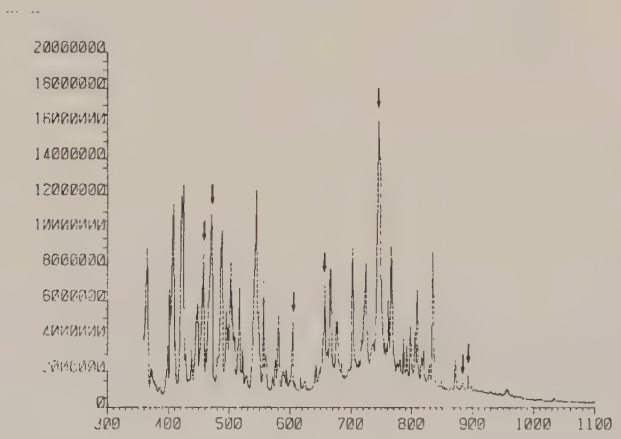


Abb. 62 GC von Ile-Gly-Gly-His-Ala-Glu-Tyr-Gly-Ala-Glu-Ala-Leu-Glu-Arg (70 nMol)
Spec 456/Ala-Leu, 467/Ile-Gly, 604/Ala-Glu, 658/Leu-Glu, 746/Tyr-Gly, 884/Glu-Tyr, 893/Gly-His

Das Peptid in Abb. 62 enthält zweimal die Sequenz Ala-Glu. Man würde erwarten, daß der entsprechende Peak im Gaschromatogramm höhere Intensität besitzt, als die anderen Dipeptidpeaks, was aber nicht der Fall ist. Das Beispiel zeigt somit, daß aus der Peakintensität nicht geschlossen werden kann, wie oft ein bestimmtes Dipeptid innerhalb der Sequenz auftritt. Aus der vorausgehenden Aminosäureanalyse erfährt man jedoch die Anzahl der Ala- und Glu-Reste im Peptid, zudem würde die Identifizierung der Spaltstücke nach einem Edmanabbau die zwei Dipeptide Glu-Tyr und Glu-Ala ergeben. Durch Kombination der Ergebnisse aus den beiden Spaltungen und der Aminosäureanalyse ist dann die genaue Sequenz ermittelbar.

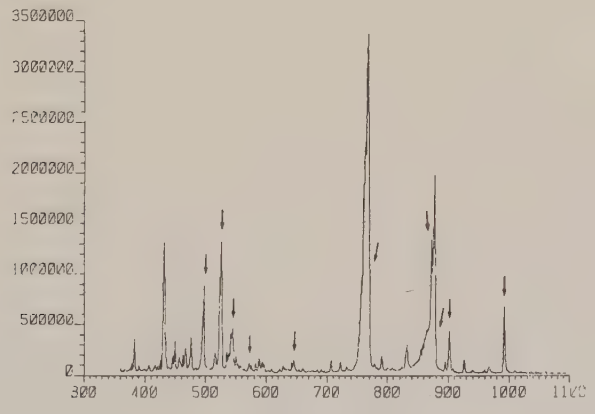


Abb. 63 GC von Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Val-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Glu-Val-Lys (40 nMol)
verestert mit MeOH / HCl (0,5 N)
Spec 496/Ser-Ala, 526/Val-Ser, 543/Asp-Val, 569/Gly-Ser, 647/Glu-Val, 768/Phe-Pro, 872/Thr-Tyr, 878/Phe-Asp, 902/Val-Lys, 993/Phe-Phe

Durch enzymatische Spaltung des in Abb. 63 angegebenen Peptides mit DAP I und IV erhält man die in der Legende aufgeführten Dipeptide. Neben den His-enthaltenden Dipeptiden wurde auch Ala-Glu nicht gefunden, wofür es im Augenblick noch keine Erklärung gibt. Zu den durch überlappende Spaltung entstandenen Dipeptiden ist zu sagen, daß sie zusammen mit einer zweiten Spaltung nach einem Edman-Abbau als mögliche Sequenzierungshilfe angesehen werden können. Aus der Aminosäureanalyse weiß man zum Beispiel, daß in der Sequenz nur 2 Val-Reste vorkommen. Zu den vier Dipeptiden mit Val werden dann nach dem zweiten Spaltversuch des um eine Aminosäure verkürzten Peptides, selbst durch überlappende Spaltung, keine neuen Dipeptide mit Val mehr entstehen, außer den schon aus der ersten Spaltung bekannten : Val-Ser, Asp-Val, Glu-Val und Val-Lys. Das Auftreten des Dipeptides Phe-Phe konnte mit Hilfe eines parallel durchgeführten Blindwertes mit DAP I alleine geklärt werden. In manchen Blindwerten mit DAP I konnten einzelne Dipeptide nachgewiesen werden, obwohl keine Peptide zugesetzt worden waren. Dies wurde auch von Seifert und Caprioli (8) erwähnt. Möglicherweise ist dieses Phänomen auf unterschiedliche Enzymchargen zurückzuführen. Durch parallele Blindwertstudien mit den Enzymen alleine konnten Fehlinterpretationen durch solche Dipeptide in jedem Fall ausgeschlossen werden.

Bei dem in Abb. 64 gezeigten Peptid mit seinen 29 Aminosäuren treffen mehrere Probleme der hier beschriebenen Sequenzierungsmethode aufeinander : Dipeptide mit His, erforderliche Abänderung der Derivatisierung zur Identifizierung von Asp und Asn, sowie das gehäufte Auftreten weniger Aminosäuren. Überlappende Spaltungen und häufiges Vorkommen bestimmter Aminosäuren verursachen in diesem Beispiel, daß mehrmals gleiche Dipeptide entstehen. Aus der Aminosäureanalyse ergibt sich als Zusammensetzung des Peptides : 8 Ala, 6 Leu, 5 Asp, 3 His, je 2 Gly und Ser sowie je ein Val, Pro und Lys, also wenige Aminosäuren, von denen Ala, Leu und Asp (Asn) besonders oft vorkommen.

Dadurch, daß in diesem Versuch ein Teil der zweifellos entstehenden Dipeptide nicht gefunden wurde, war eine Sequenzbestimmung auch mit Hilfe der Ergebnisse aus der Aminosäureanalyse und aus einer zweiten Spaltung nach einem Edmanabbau in diesem Fall nicht möglich. Die Sequenz dieses Peptides sollte erneut untersucht werden, wenn die beschriebenen Probleme zur Identifizierung His-haltiger Dipeptide und zur optimalen Derivatisierung (siehe Kapitel 6.11) eingehender untersucht worden sind. Wenn alle möglichen Dipeptide des vorliegendes Peptides mit GC / MS nachgewiesen werden können, kann auch die Sequenz durch eine zusätzliche Zeitstudie (Probenentnahme aus dem Spaltansatz zu verschiedenen Zeiten) ermittelt werden. Dabei kommt es zur meßbaren aufeinanderfolgenden Abspaltung der Dipeptide vom Aminoende her, wie es in dem Versuch zur Sequenzierung mit FAB-MS beschrieben ist (Kapitel 6.12).

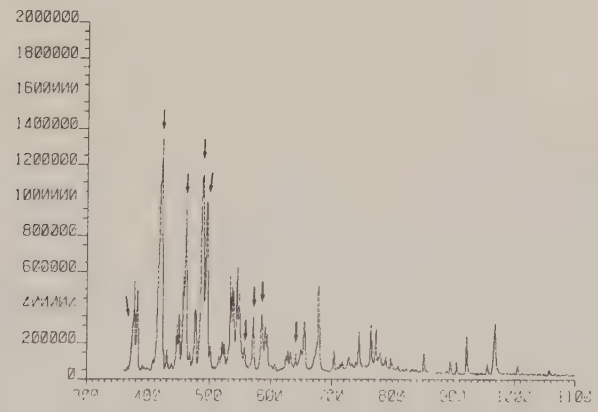


Abb. 64 GC von Val-Ala-Asp-Ala-Leu-Ala-Asn-Ala-Ala-Gly-His-Leu-Asp-Asp-Leu-Pro-Gly-Ala-Leu-Ser-Ala-Leu-Ser-Asp-Leu-His-Ala-His-Lys (40 nMol) verestert mit MeOH / HCl (0,5 N)
Spec 374/Ala-Ala, 418/Val-Ala, 462/Leu-Ala, 486/Ala-Leu, 494/Asp-Ala, 557/Leu-Ser, 571/Ala-Asp, 585/Asp-Leu, 641/Leu-Asp

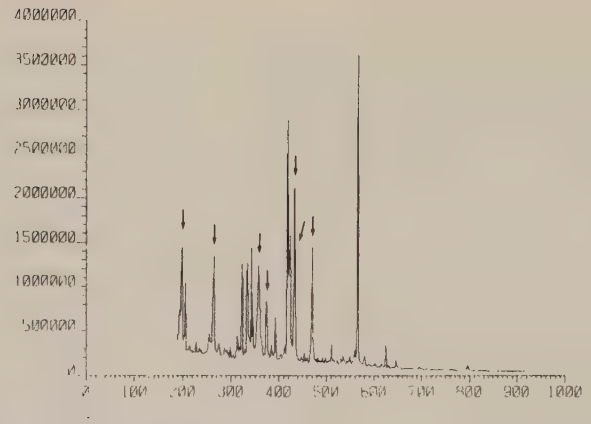


Abb. 65 GC von Glucagon (6 nMol) / Säule CP Sil 5
His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr
-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln
-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr
Spec 199/Thr-Ser, 266/Asp-Ser, 360/Thr-Phe,
374/Phe-Val, 434/Tyr-Leu und Asp-Phe,
471/Asp-Tyr

In Abb. 65 ist das Ergebnis der Spaltung von Glucagon nach gaschromatographischer Auftrennung der Dipeptide gezeigt. Dieser Versuch wurde zu Beginn der Peptidspaltungen durchgeführt. Einige Dipeptide konnten zu jener Zeit nicht nachgewiesen bzw. nicht eindeutig identifiziert werden. In der Abb. 65 sind deswegen nur die Dipeptide angegeben, die eindeutig bestimmt werden konnten. Nach der eingehenden Untersuchung des His-Problemes und einiger labiler Dipeptide wird ein erneuter Sequenzierungsversuch von Glucagon unternommen werden. Die Identifizierung der aus Glucagon abgespaltenen Dipeptide erfolgte in diesem Fall mit nur etwa 1 nMol Probe (6 nMol Glucagon waren gespalten und derivatisiert worden und davon ein Fünftel gaschromatographisch aufgetrennt worden). Im Gaschromatogramm entstanden selbst mit diesen geringen Mengen intensive Peaks, deren Massenspektren auch bei wesentlich kleinerer Intensität noch einwandfreie Sequenzbestimmungen ermöglichen (siehe Abb. 45,

56 und 60). Es ist somit eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit dieser Sequenzierungsmethode denkbar. Callahan et al. (30) haben bereits 1972 die Sequenzierung von Glucagon mit DAP I durchgeführt. Sie konnten den vorderen Teil des Peptides bis Arg-Arg sequenzieren; an dieser Stelle stoppt DAP I, wenn die Spaltung bei einem pH-Wert von 5,0 durchgeführt wird. Die bis zu dieser Stelle abgespaltenen Dipeptide konnten ausnahmslos durch Papierchromatographie, Säulenchromatographie und Aminosäureanalyse identifiziert werden. Die dafür benötigte Probenmenge war allerdings 850 nMol und die erforderliche Zeit mehrere Tage. Die Identifizierung der Dipeptide ist somit um den Faktor 10^3 empfindlicher und wesentlich zeitsparender (2 Stunden).

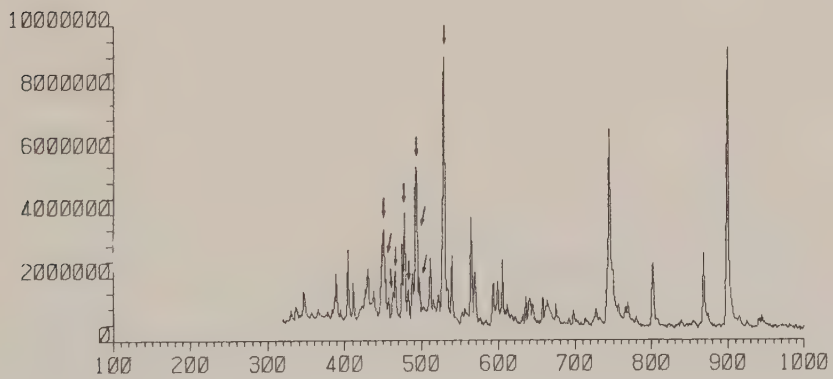


Abb. 66 GC von Bonobo α-core (50 nMol)
Leu-Leu-Ser-His-Cys-Leu-Leu-Val-Thr-Leu
-Ala-Ala-His-Leu-Pro-Ala-Glu-Phe-Thr-Pro
-Ala-Val-His-Ala-Ser-Leu-Asp-Lys-Phe-Leu
-Ala-Ser-Val-Ser-Thr-Val-Leu-Thr-Ser-Lys
Spec 447/Pro-Ala, 450/Thr-Val, 466/Ala-Ala
und Ala-Ser, 478/Leu-Val, 482/Thr-Pro,
488/Val-Leu, 493/Thr-Leu, 497/Val-Ser,
529/Leu-Leu

Bonobo α-core ist das längste Peptid, das in dieser Versuchsreihe gespalten wurde. Nach den bisher aufgezeigten und teilweise noch bestehenden Schwierigkeiten war es hier in erster Linie von Bedeutung zu erfahren, ob die Gaschromatogramme derartig umfangreicher Dipeptidmischungen noch übersichtlich genug sind, um daraus die gewünschten Informationen zu erhalten. Wie in Abb. 66 gezeigt ist, ist das sehr wohl der Fall, da die Abszisse zur besseren Identifizierung gespreizt werden kann. Von Bedeutung ist aber vor allem, daß nur wenige Dipeptidpeaks überlappen und wenn, dann auch nur teilweise (siehe auch Abb. 33). Zur Sequenzbestimmung von Peptiden dieser Länge ist in der Regel eine Zeitstudie erforderlich, die aber mit der gleichen Probenmenge durchgeführt werden kann.

Die mit DAP I und DAP IV durch enzymatische Spaltung sequenzierten Peptide mit 3 - 40 Aminosäuren geben einen Überblick über den derzeitigen Stand der Methode. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigen die Listen 1 und 2, die eindeutig identifizierten Dipeptide sind jeweils durch Unterstreichung (-----) gekennzeichnet.
Bei kurzen Peptiden (Tri- und Tetrapeptiden) kann in vielen Fällen bereits nach einer Spaltung die Aminosäuresequenz ermittelt werden, da durch die im DAP I-Präparat enthaltene Nebenaktivität oft überlappende Dipeptide entstehen. Die Aminosäurezusammensetzung kann als bekannt vorausgesetzt werden, und es gibt somit bei kurzen Peptiden in der Regel nur eine mögliche Sequenz, vorausgesetzt, daß alle Dipeptide nachgewiesen werden können. Bei diesen Peptiden ist eine Probenmenge von 1 - 10 nMol daher vollkommen ausreichend. Die Derivatisierung und der Nachweis einzelner Dipeptide bedürfen noch eingehender Untersuchungen. Während eine Unterscheidung zwischen Asp und Asn bzw. Glu und Gln durch Derivatisierung mit PFPA und anschließend mit CH_2N_2 möglich ist, sind die Aminosäuren nach Umsetzung mit MeOH / HCl und PFPA nur als Asp oder Glu identifizierbar, was durch Hydrolyse der Amidbindung verursacht wird. Der Nachweis von

His in Peptiden ist dagegen eher ein gaschromatographisches Problem, obwohl auch hier durch abgeänderte Derivatisierungsbedingungen (Veresterung mit MeOH / HCl 0,5 N statt 3 N) in einigen Fällen bereits eine Identifizierung erreicht wurde. Zum Nachweis von Arg und Trp mittels GC / MS wurden noch keine Versuche unternommen, die Identifizierung von Peptiden mit diesen Aminosäuren kann aber mit FAB-MS erfolgen, wie es in Kapitel 6.12 beschrieben ist. Bei längeren Peptiden (etwa bis 15 Aminosäuren) ist es möglich, die Aminosäuresequenz durch eine zusätzliche Spaltung des um eine Aminosäure verkürzten Peptides (Edmanabbau) zu ermitteln. Auch hier ist eine Sequenzbestimmung mit weniger als 10 nMol ohne weiteres durchführbar. Zur Bestimmung der Reihenfolge der Aminosäuren in Peptiden mit 15 - 40 Resten werden die besten Ergebnisse erzielt, wenn man die beiden Peptidspaltungen (Ausgangspeptid und um eine Aminosäure verkürztes Peptid) als Zeitstudie durchführt, indem man zu bestimmten Zeiten Proben aus dem Spaltansatz entnimmt. Durch einen so gestalteten Versuch wird die Schwierigkeit umgangen, daß sich wiederholende Sequenzen schlecht einordnen lassen. Eine Zeitstudie kann mit etwa der gleichen Peptidmenge durchgeführt werden und ca. einem Zehntel bis einem Zwanzigstel der Enzymmenge. Wenn auch an einigen Problemen beim Nachweis von Dipeptiden noch weitere Untersuchungen erforderlich sind, so kann doch gesagt werden, daß die Methode der GC / MS - Identifizierung den früher angewendeten Verfahren (25, 95, 101) in drei Punkten überlegen ist : Erstens ist die Empfindlichkeit gegenüber früher angewendeten Verfahren wesentlich höher, wie die Spaltung von Glucagon zeigt. Dies betrifft zum einen die notwendige Ausgangsmenge des Peptides und zum anderen die Peptidmenge, die noch eindeutig identifiziert werden kann. Dadurch ist auch eine sparsamere Verwendung der Enzyme möglich geworden. Als dritter und ebenso bedeutender Punkt ist die große Zeitersparnis durch diese Nachweismethode zu nennen.

Liste 1

Gly-Leu-Tyr

Gly-Ala-Phe

Gly-Ala-Gly

Leu-Gly-Phe

Gly-Phe-Ala-Ala

Gly-Pro-Ala

Val-Gly-Ser-Glu

Ala-His-Gly-Lys

Leu-Leu-Val-Tyr

His-Leu-Asp-Asn-Leu-Lys

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Lys

Val-His-Leu-Thr-Asp-Ala-Glu-Lys

Gly-Glu-Gly-Phe-Leu-Gly-D-Phe-Leu

Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu

Tyr-Ser-Met-Glu(OBut.)-His-Phe-Arg-Trp-Gly

Val-Leu-Asn-Ser-Phe-Ser-Glu-Gly-Leu-Lys

Leu-Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg

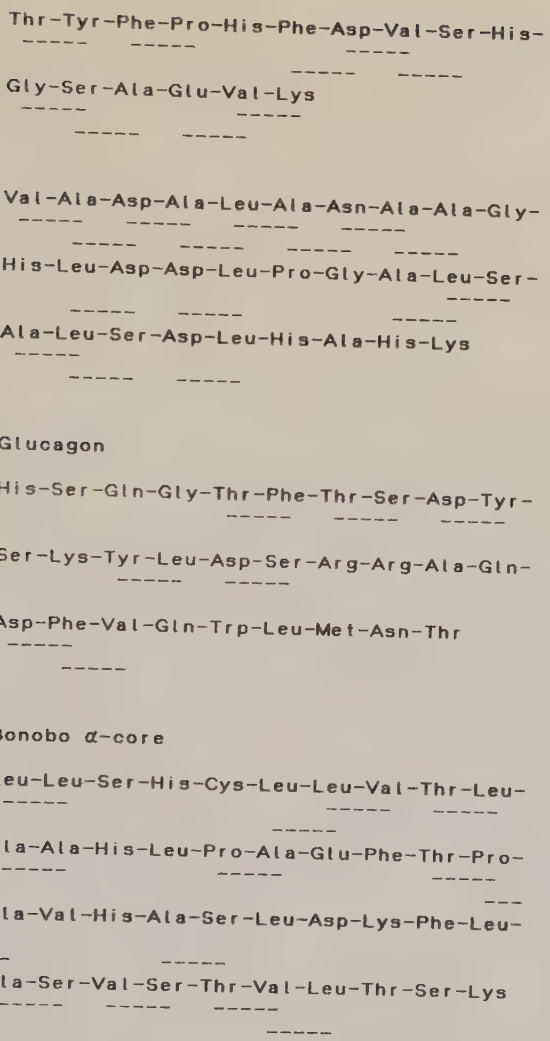
Val-Val-Ala-Gly-Val-Ala-Thr-Ala-Leu-Ala-Lys

Val-Asn-Val-Asp-Glu-Ile-Gly-Gly-Glu-Ala-Leu-Gly-Arg

Ile-Gly-Gly-His-Ala-Glu-Tyr-Gly-Ala-Glu-

Ala-Leu-Glu-Arg

Liste 2


Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Val-Ser-His-
Gly-Ser-Ala-Glu-Val-Lys
Val-Ala-Asp-Ala-Leu-Ala-Asn-Ala-Ala-Gly-
His-Leu-Asp-Asp-Leu-Pro-Gly-Ala-Leu-Ser-
Ala-Leu-Ser-Asp-Leu-His-Ala-His-Lys
Glucagon
His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-
Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-
Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr
Bonobo α-core
Leu-Leu-Ser-His-Cys-Leu-Leu-Val-Thr-Leu-
Ala-Ala-His-Leu-Pro-Ala-Glu-Phe-Thr-Pro-
Ala-Val-His-Ala-Ser-Leu-Asp-Lys-Phe-Leu-
Ala-Ser-Val-Ser-Thr-Val-Leu-Thr-Ser-Lys

6.9 Untersuchungen zur Empfindlichkeit der Methode anhand der Spaltung von Glucagon

An Glucagon als Beispiel wurden einige Untersuchungen zur Empfindlichkeit der Methode durchgeführt. Dazu wurden Spaltzeit, Glucagonkonzentration und Peptidkonzentration verändert. Die erhaltenen Ergebnisse sind jeweils in Form einer Tabelle dargestellt. Da diese Veruche ebenfalls zu Beginn der ganzen Peptidspaltungen durchgeführt wurden, sind hier nur die Dipeptide aufgeführt, die zu jener Zeit identifiziert werden konnten. Sobald genauere Kenntnis des His-Problemes besteht, wird dieser Versuch wiederholt werden.

1) Spaltung von Glucagon (6 nMol) mit gleichen Enzymmengen bei verschiedenen Zeiten

Jeweils gleiche Mengen Glucagon (6 nMol) wurden 10, 30, 60, 120 und 180 Minuten mit gleichen Enzymmengen (0,1 Unit DAP I und 0,1 Unit DAP IV) bei 37° C inkubiert, mit MeOH / HCl (3 N) und PFPA derivatisiert und ein Fünftel davon mit GC / MS untersucht. Das Ergebnis ist in dem folgenden Schema zu sehen. Die untereinander angegebenen Aminosäuren stellen dabei jeweils ein abgespaltenes Dipeptid der von links (Aminoende) nach rechts (Carboxylende, wobei die letzte Aminosäure Thr aus Platzgründen weggelassen wurde) verlaufenden Glucagonsequenz dar. Die identifizierten Dipeptide sind mit + gekennzeichnet.

Zeit	His-Ser	Gln-Gly	Thr-Phe	Thr-Ser	Asp-Tyr	Ser-Lys	Tyr-Leu	Asp-Ser	Arg-Arg	Ala-Gln	Asp-Phe	Val-Gln	Tr Le
10			+	+			(+)						
30			+	+	(+)		+	+			+		
60			+	+	+		+	+			+		
120			+	+	+		+	+			+		
180			+	+	+		+	+			+		

Minuten

Aus dieser Versuchsreihe ergibt sich, daß nach 30 Minuten bereits alle Dipeptide nachweisbar waren, die auch in Abb. 65 gefunden worden waren. Dieses Ergebnis steht auch in Einklang mit den Resultaten in Kapitel 6.12, in dem die Zeitstudie einer Peptidspaltung mit dieser Enzymkonzentration zeigt, daß nach einer halben Stunde schon der überwiegende Teil des Substrates gespalten ist. Eine Spaltzeit von 180 Minuten ist deshalb nur bei längeren Peptiden notwendig, zur Sicherheit, daß das Peptid möglichst vollständig gespalten wird.

2) Spaltung von Glucagon (6 nMol) mit verschiedenen Enzymmengen bei verschiedenen Zeiten

Bei diesen Versuchen wurden wieder gleiche Glucagonkonzentrationen verwendet, während gleichzeitiger Variierung der Enzymkonzentration und Spaltzeit. Die Änderungen sind über jeder Tabelle angegeben.
Die Versuche mit der 10 und 180 minütigen Spaltung waren weggelassen worden, da hieraus, entsprechend dem vohergehenden Schema, keine Ergebnisse von Bedeutung erwartet wurden. Diese Untersuchungsreihen zeigten, daß schon ein Fünftel der bisher verwendeten Enzymkonzentration ausreichend ist, um bereits nach 120 Minuten alle Dipeptide identifizieren zu können, die zu jener Zeit nachweisbar waren.

Zeit	His-Ser	Gln-Gly	Thr-Phe	Thr-Ser	Asp-Tyr	Ser-Lys	Tyr-Leu	Asp-Ser	Arg-Arg	Ala-Gln	Asp-Phe	Val-Gln	Trp-Leu
a) Spaltung mit jeweils 0,1 Unit DAP I und DAP IV													
30 Minuten			+	+									
60 Minuten			+	+				+					
120 Minuten			+	+	+		+	+			+		
b) Spaltung mit jeweils 0,05 Unit DAP I und DAP IV													
30 Minuten			+	+									
60 Minuten			+	+	(+)		+	+					
120 Minuten			+	+	+		+	+			+		
c) Spaltung mit jeweils 0,03 Unit DAP I und DAP IV													
30 Minuten			+	+			(+)						
60 Minuten			+	+	+		+						
120 Minuten			+	+	+		+	+			+		

3) Spaltung von Glucagon (verschiedene Konzentrationen) mit gleichen Enzymmengen bei gleicher Zeit

Bei diesen Versuchen wurden mit gleichen Enzymmengen (jeweils 0,1 Unit) bei konstanter Zeit (120 Minuten) verschiedene Glucagonmengen (2, 4 und 6 nMol) gespalten.

Zeit	His-Ser	Gln-Gly	Thr-Phe	Thr-Ser	Asp-Tyr	Ser-Lys	Tyr-Leu	Asp-Ser	Arg-Arg	Ala-Gln	Asp-Phe	Val-Gln	Tr Le
a) 2 nMol Glucagon													
120			+	+									
b) 4 nMol Glucagon													
120			+	+	+		+						
c) 6 nMol Glucagon													
120			+	+	+		+	+			+		

Minuten

Das Ergebnis dieser Untersuchung ist, daß bei einer Spaltzeit von 120 Minuten nur aus der Probe mit 6 nMol Glucagon alle zur damaligen Zeit identifizierbaren Dipeptide in ausreichender Konzentration entstanden, um eine GC / MS - Bestimmung zu ermöglichen. Dies besagt aber nicht, daß hier die Nachweisgrenze liegt. Wie zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, wurde von jeder Probe nur ein Fünftel mit GC / MS untersucht, das heißt, daß nur ca. 1 nMol zum Nachweis herangezogen wurde. Durch Verkleinerung des Probevolumens bei einem Spaltansatz könnte die Empfindlichkeit eventuell noch gesteigert werden, da hierdurch ein schnelleres Auffinden des Substrates durch das Enzym gewährleistet ist. Die Nachweisgrenze ist neben der unterschiedlichen Nachweisempfindlichkeit der einzelnen Dipeptide somit von weiteren Faktoren abhängig, in der Hauptsache vom Probevolumen des Spaltansatzes, von der Enzymkonzentration und der Spaltzeit. Aufgrund der bisherigen Versuche kann gesagt werden, daß mit dieser Methode die Sequenz von Peptiden in der Konzentration von 1 - 10 nMol ermittelt werden kann.

6.10 Prüfung der Langzeitstabilität von Dipeptiden gegenüber DAP I und DAP IV

Um die Langzeitstabilität der durch Spaltung entstandenen Dipeptide gegenüber DAP I und DAP IV zu prüfen, wurden 50 nMol des Peptides Bonobo α-core 1,5 und 21 Stunden bei 37° C mit der Enzymmischung gespalten (Abb. 67 und 68). Die Retentionszeiten der PFP-Dipeptidmethylester sind dabei weitgehend identisch. Es ergibt sich daraus auch, daß durch lange Spaltzeiten mit DAP I und DAP IV weder bereits entstandene Dipeptide in sichtbaren Mengen zersetzt werden, noch, daß lange Spaltzeiten eine wesentliche Erhöhung der Spaltrate bewirken. Nach 21 Stunden Inkubation sind somit noch alle Dipeptide in vergleichbaren Mengen vorhanden, wie sie während den ersten eineinhalb Stunden entstanden sind.

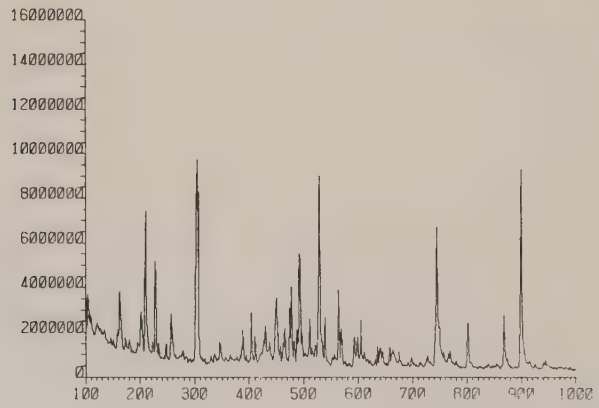


Abb. 67 Bonobo α-core nach Spaltung (1,5 Stunden bei 37° C) und Derivatisierung

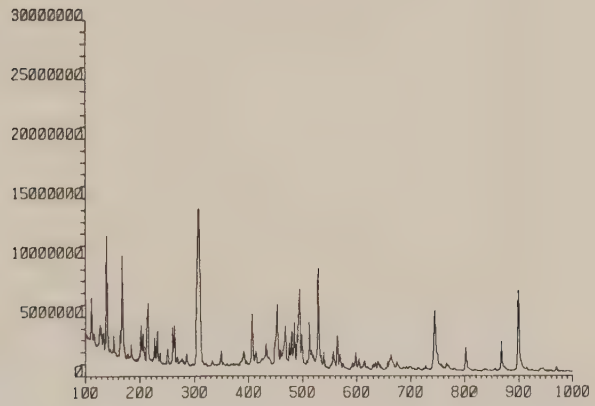


Abb. 68 Bonobo α-core nach Spaltung (21 Stunden bei 37° C) und Derivatisierung

6.11 Untersuchung der Stabilität von Dipeptiden und den optimalen Derivatisierungsbedingungen

Bei den Untersuchungen der Blindwerte mit Dipeptiden (Mischung I siehe Kapitel 6.5) zeigte sich eine relativ hohe Instabilität einiger Dipeptide in wäßriger Lösung. In den anfangs hergestellten Dipeptidlösungen waren nach ca. einmonatiger Aufbewahrung im Kühlschrank nicht mehr alle eingewogenen Dipeptide nachweisbar. Zur Überprüfung dieses Phänomens wurde die Dipeptidmischung (Mischung I) sofort nach dem Lösen bzw. nach vierwöchiger Aufbewahrung in wäßriger Lösung bei 4° C derivatisiert und gaschromatographiert (Abb. 69 und 70).

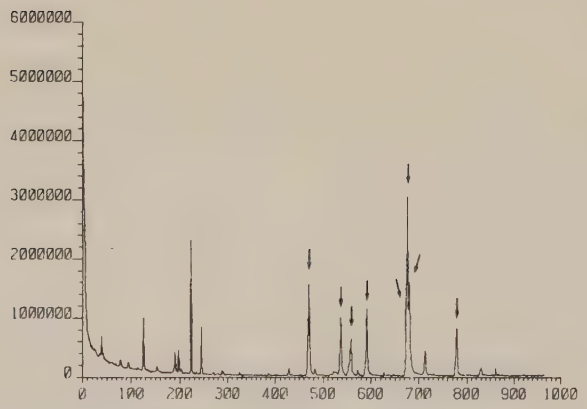


Abb. 69 GC von Mischung I nach sofortiger Derivatisierung
Spec 471/Val-Leu, 538/Ser/Leu, 559/Glu-Ala,
592/Asp-Pro, 672/Met-Pro, 677/Phe-Val,
681/Thr-Phe, 779/Val-Tyr

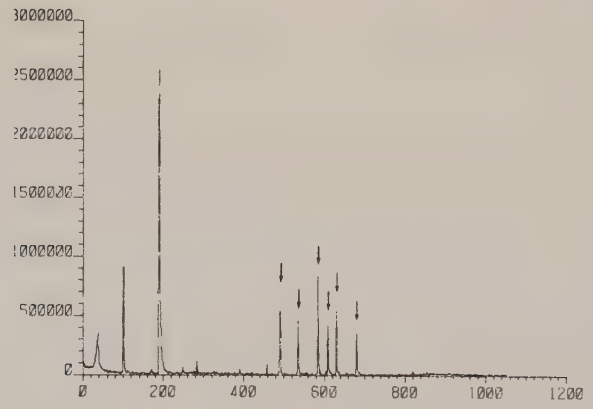


Abb. 70 GC von Mischung I, Derivatisierung nach vierwöchiger Aufbewahrung in wäßriger Lösung bei 4° C
Spec 490/Val-Leu, 535/Glu-Ala, 584/Asp-Pro,
609/Thr-Phe, 630/Phe-Val, 680/Val-Tyr

Aus den Versuchen ergab sich, daß Dipeptide mit labilen Peptidbindungen (z.B. Ser-Leu, Met-Pro) bereits bei der Aufbewahrung in bidest. Wasser, das einen schwach sauren pH besitzt, hydrolisiert werden. Mit dieser Auswirkung ist somit in geringen Maßen auch unter Spaltbedingungen zu rechnen, da der verwendete Puffer einen pH-Wert von 6,5 besitzt (wie bereits in Kapitel 6.5 erwähnt). Um die Zersetzung von Dipeptiden in dieser Hinsicht möglichst gering zu halten, wurden in den in Kapitel 6.5 beschriebenen Versuchen nur frisch eingewogene Dipeptidlösungen verwendet. Aus den Spaltversuchen der Peptide ergab sich, daß besonders Dipeptide mit den Aminosäuren Ser, Met, und His bei der üblichen Derivatisierung mit MeOH / HCl (3 N) und PFPA leicht der Hydrolyse unterliegen und daher gelegentlich bei der Identifizierung (GC / MS) nicht oder kaum mehr nachweisbar waren (z.B. Glucagon Abb. 65).
Es wurden daher Versuche unter milderen Derivatisierungsbedingungen durchgeführt (siehe auch 2.12.2) : Veresterung mit 0,5 bzw. 0,1 N methanolischer Salzsäure, die aber nur Teilerfolge brachten. Sobald die, für verschiedene Dipeptide notwendigen, unterschiedlichen Derivatisierungsbedingungen eingehend genug untersucht sind, ist eine detailliertere Angabe über die Empfindlichkeit der Methode möglich.

6.12 Peptidsequenzierung mit FAB - MS

Die kürzlich (150, 151) eingeführte FAB - Ionisierung hat die Anwendung der Massenspektrometrie in der biochemischen Analytik wesentlich erweitert. Hierbei werden die zu untersuchenden Substanzen in Glycerin oder anderen schwer flüchtigen polaren Lösungsmitteln gelöst, auf ein Target aufgebracht und in der Ionenquelle des Massenspektrometers mit schnellen (energiereichen), neutralen Argon- oder Xenonatomen beschossen. Die Moleküle werden durch eine Protonierung mit Wasserstoffen des Lösungsmittels ionisiert, durch einen Impuls aus der Oberfläche der Glycerinmatrix abgelöst, und dann, wie üblich als Ionen im Massenspektrometer behandelt. Die Fragmentierung der Molekülionen ist ähnlich derjenigen bei der chemischen Ionisierung. Mit dieser sehr einfachen MS - Ionisierungstechnik können vor allem polare Moleküle, underivatisierte Peptide, Nukleoside und Nukleotide, polare Farbstoffe u. a. untersucht werden. Peptide fragmentieren bevorzugt an den Peptidbindungen (152), weshalb diese Methode besonders zur Sequenzanalyse von Peptiden geeignet ist (153).

Wir haben die Methode eingesetzt und am Beispiel des Peptides Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Lys den Verlauf der Spaltung mit DAP I untersucht; dabei war angestrebt, sowohl das Restpeptid aus der Spaltung, als auch die entstehenden Dipeptide zu identifizieren. Abb. 71 zeigt das FAB - Massenspektrum von 10 nMol Heptapeptid in Glycerin gelöst. Man erkennt das Pseudomolekülion (M +H) bei m/e 858. Die Sequenz kann aus dem Spektrum nicht abgeleitet werden; die Ionen bei m/e 185, 277, 369, 461, 553, 645, 737, 829 und 921 sind Aggregaten von Glycerin zuzuordnen.

Abb. 72 und 73 zeigen die Massenspektren einer Dipeptidmischung aus Tyr-Gly, Gly-Phe, Met-Arg (je 10 nMol) bzw. einer Spaltung des obigen Heptapeptides.

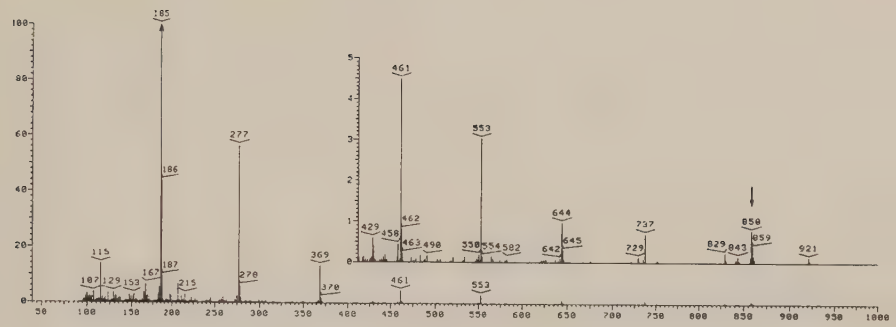


Abb. 71 FAB - Massenspektrum von 10 nMol
Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Lys
m/e 858/Heptapeptid

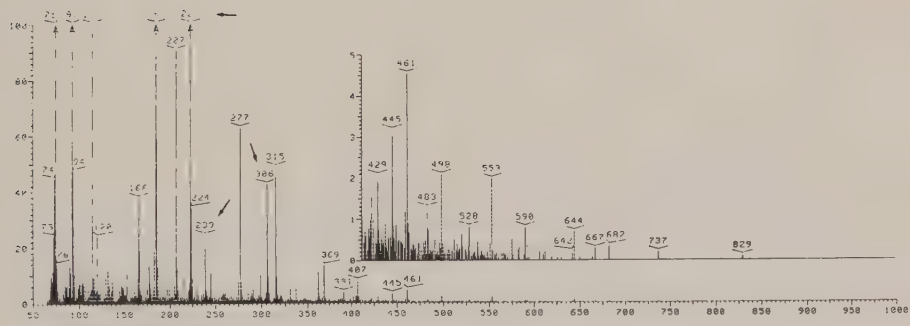


Abb. 72 FAB - Massenspektrum der Dipeptidmischung
(Tyr-Gly, Gly-Phe, Met-Arg) je 10 nMol
m/e 223/Gly-Phe, 239/Tyr-Gly, 306/Met-Arg

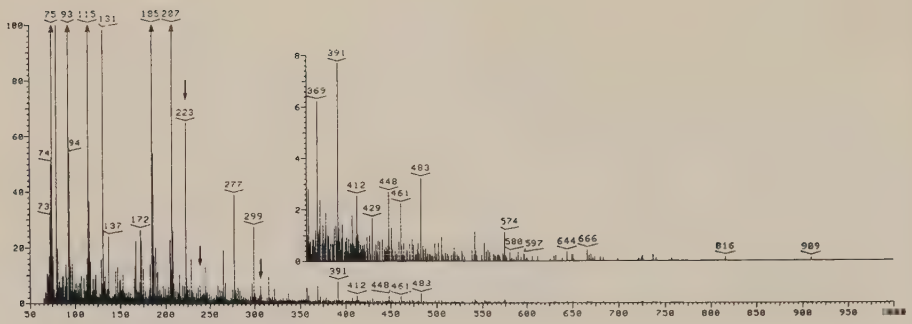


Abb. 73 FAB - Massenspektrum des Heptapeptides (10 nMol) nach 180 Minuten Spaltzeit mit DAP I (0,01 Unit) m/e 223/Gly-Phe, 239/Tyr-Gly, 306/Met-Arg

Im Spektrum der Abb. 72 sind die Ionen bei m/e 223, 239 und 306 den Molekülionen +H der Dipeptide Gly-Phe, Tyr-Gly, und Met-Arg zuzuordnen; sie entsprechen jeweils 10 nMol Dipeptid. Von diesen Ionen ist in Abb. 73 nur das Ion m/e 223 (Gly-Phe) sicher erkennbar, während die anderen Ionen keine größere Intensität als der Untergrund besitzen. Hier wurden zwar 10 nMol Heptapeptid enzymatisch gespalten, da der enzymatische Abbau aber nicht vollständig erfolgt (siehe Diskussion zu Abb. 74) stehen zur FAB-Messung weniger als 10 nMol der abgespaltenen Dipeptide zur Verfügung. Unsere Erfahrungen aus diesem Beispiel zeigen demnach, daß man bei der enzymatischen Spaltung von 10 nMol Peptid nicht alle entstehenden Dipeptide sicher identifizieren kann.
Da in diesem Massenspektrum auch kein Penta- (Gly-Phe-Met-Arg-Lys) bzw. Tripeptid (Met-Arg-Lys) identifizierbar war, ergab sich weiterhin, daß die Enzymkonzentration zu hoch war, um noch ungespaltenes Penta- bzw. Tripeptid nachweisen zu können. Bei dem verwendeten Verhältnis von Enzym zu Substrat (0,01 Unit pro 10 nMol Peptid) werden somit die entstehenden Penta- und Tripeptidmoleküle des untersuchten

Heptapeptides im Laufe der Spaltzeit (180 Minuten) wieder so weit hydrolisiert, daß sie mit FAB - MS nicht mehr nachweisbar sind.

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob durch verminderte Enzymkonzentration die Zu- und Abnahme der Zwischenprodukte der enzymatischen Spaltung (hier Penta- und Tripeptid) sichtbar gemacht werden kann. Hierbei wurden 600 nMol Heptapeptid mit 0,02 Unit DAP I gespalten, das entspricht einem Enzym-Substrat-Verhältnis von 0,000$\bar{3}$ Unit pro 10 nMol, also einem Dreißigstel der vorher verwendeten Enzymkonzentration. In bestimmten Zeitabständen wurden Proben entnommen, die jeweils 10 nMol Ausgangspeptid entsprachen. In Abb. 74 sind die prozentualen Intensitäten (bezogen auf die Gesamtintensität) der einzelnen Peptidpeaks gegen die Spaltzeiten aufgetragen.

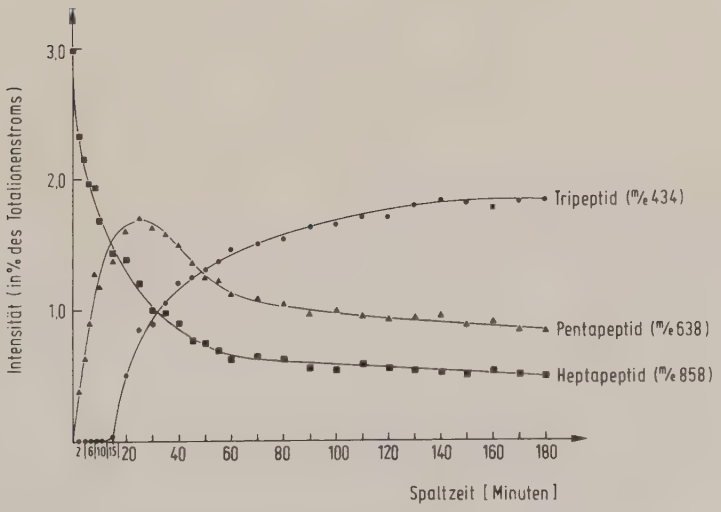


Abb. 74 Zeitstudie zur Spaltung von Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Lys

Jeder Meßpunkt in der Abbildung entspricht 10 nMol Heptapeptid, das verschieden stark gespalten ist. Man erkennt eine schnelle Abnahme der Konzentration des Heptapeptides während der ersten 30 Minuten Spaltzeit auf ca. 30 % der Ausgangsmenge. Gleichzeitig steigt die Konzentration des Pentapeptides und zeitverzögert, um ca. 15 Minuten, die des Tripeptides an. Letztere ist wiederum an die Konzentrationsabnahme des Pentapeptides gekoppelt. Nach 60 Minuten Spaltzeit ist die Anfangskonzentration des Heptapeptides auf Werte unterhalb der Meßfehlergrenze gefallen, so daß eine weitere Abnahme nicht mehr meßbar ist; das Enzym-Substrat-Verhältnis wird so ungünstig, daß kaum mehr Spaltung erfolgt. Die Konzentration des Pentapeptides erreicht nach 30 Minuten ein Maximum. Aus der Abnahme des Heptapeptides ist zu schließen, daß nach dieser Zeit etwa 60 % des Ausgangspeptides als Pentapeptid vorliegen. Die Konzentration, bei der kaum mehr weitere Spaltung erfolgt, ist hier nach ca. 120 Minuten erreicht. In diesem Bereich erlangt auch die Tripeptidkonzentration ein Maximum. Uber die Abnahme des Tripeptides und die Entstehung von Lys als C-terminale Aminosäure können keine Angaben gemacht werden, da dafür die Spaltzeit zu kurz war.

Als Ergebnis dieser Studie der Konzentrationszu- und -abnahmen des Ausgangs- und der Folgepeptide in Abhängigkeit von der Spaltzeit kann gesagt werden, daß keine vollkommene Spaltung des Ausgangspeptides und der nachfolgend entstandenen Peptide erfolgte. Die Hydrolyse des Hepta- und Pentapeptides in diesem Versuch war nur während der ersten 120 Minuten meßbar. Übertragen auf die in Kapitel 6.8 beschriebenen Versuche bedeutet dies, daß bei einer 30 mal höheren Enzymkonzentration (wie sie dort verwendet wurde) und einer Spaltzeit von 180 Minuten die Abspaltung der ersten Dipeptide vom Aminoende eines Peptides her bereits in wenigen Minuten zum überwiegenden Teil erfolgt. Somit ist zu erwarten, daß die durch die Spaltung neu gebildeten Peptide in ausreichendem Maß weiter hydrolisiert werden, und daß aus dem Anfangspeptid in ausreichender Konzentration Dipeptide

für den Nachweis mit GC / MS entstehen. Um diese Kinetik durchführen zu können, war es notwendig, die in den vorausgehenden Spaltversuchen verwendete Enzymmenge auf einen Bruchteil zu reduzieren. Mit Hilfe dieser Enzymkinetiken wäre es möglich, Aussagen über die erforderliche Zeit zur Abspaltung der unterschiedlichen Dipeptide zu machen.
Wie aus den Abbildungen dieses Kapitels zu ersehen ist, kann mit der FAB - MS - Methode auch der Nachweis Arg-haltiger Peptide erfolgen, da keine Derivatisierung und keine Auftrennung im GC notwendig sind. Aus den gleichen Gründen sind Peptide mit den Aminosäuren Asn, Gln, His und Trp identifizierbar. Untersuchungen zu Peptidspaltungen mit FAB - MS sind aber an dem hier zur Verfügung stehendem Gerät bis jetzt nur in einem Molekulargewichtsbereich bis etwa 1300 durchführbar.

7. ZUSAMMENFASSUNG

der Peptidsequenzierungen

Seitdem genauere Kenntnis über die Substratspezifität von DAP I besteht, beschäftigen sich mehrere Arbeitsgruppen mit dieser Art der enzymatischen Sequenzierung von Peptiden. Durch die Entdeckung und Charakterisierung von DAP IV besteht sogar die Möglichkeit, alle Peptide mit L-Aminosäuren (mit D-Aminosäuren nur eingeschränkt) durch Verwendung von DAP I und DAP IV in Dipeptide zu spalten, sofern kein Pro an ungerader Stelle innerhalb des Peptides vorhanden ist. Dieses Problem wird vielleicht einmal durch die, bisher noch nicht näher charakterisierte, DAP V gelöst. Bei der enzymatischen Spaltung von Peptiden kommt es zur sequentiellen Freisetzung von Dipeptiden vom Aminoende her. Wird von einer aliquoten Menge des zu untersuchenden Peptides parallel erst ein Edman-Abbau-Schritt gemacht (oder eine Aminosäure an das Aminoende ankondensiert), so erhält man nach Spaltung dieses Peptides die überlappenden Dipeptide. Aus den Ergebnissen beider Spaltversuche (eventuell mit Probennahme in bestimmten Zeitabständen) kann dann die Aminosäuresequenz des untersuchten Peptides abgeleitet werden.

Die Identifizierung der Dipeptide erfolgte anfangs durch Papier- und Säulenchromatographie, neuerdings nach Derivatisierung mit Gaschromatographie / Massenspektrometrie (GC / MS). Die GC / MS - Methode ist gegenüber den früher angewendeten Verfahren wesentlich empfindlicher und zeitsparender. Bei den eigenen Versuchen wurden die ersten Peptidsequenzierungen mit Dünnschichtchromatographie (DC), Dünnschichtelektrophorese und Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) überprüft, um die Ergebnisse mit den in der

Literatur gemachten Angaben vergleichen zu können. In den folgenden Versuchen erfolgte die Identifizierung ausschließlich mit GC / MS.

Für die Untersuchungen wurde die mit Affinitätschromatographie gereinigte DAP IV verwendet, die frei von, die Peptidsequenzierung störende, Nebenaktivität war. DAP I wurde von Boehringer Mannheim bezogen. Das Enyzm war zur Stabilitätserhöhung von Boehringer Mannheim mit 50 % Glycerin versetzt worden und mußte deswegen vor dem Einsatz erst dialysiert werden. Im Laufe der Untersuchungen zeigte sich, daß auch in der DAP IV-Lösung von der Anreicherung her Verbindungen enthalten waren, die den Untergrund bei der anschließenden Identifizierung mit GC / MS verstärkten. In diesem Zusammenhang wurden die möglichen Inhaltsstoffe eines Spaltansatzes einzeln untersucht (Verbindungen aus der Enzymanreicherung, Bestandteile des Puffers und der verwendeten Dialysemembranen, sowie Verunreinigungen des Wassers). Dies führte zu einem besseren Verständnis der bisher teilweise unbekannten Peaks im GC, vor allem im vorderen Teil bis Spec 300, und zur Erniedrigung des Untergrundes.

In den anschließend untersuchten Blindwerten ohne Peptide und ohne Enzyme waren weder Aminosäuren noch Dipeptide nachweisbar. Bei Inkubation von DAP I und/oder DAP IV mit Puffer bei 37° C für drei oder mehrere Stunden wurden in manchen Fällen Dipeptide gefunden, obwohl keine Peptide zugesetzt worden waren. Im Laufe der durchgeführten Spaltungen zeigte sich, daß dieses Phänomen auf unterschiedliche Reinheit der verwendeten Enzyme zurückzuführen ist, da zum einen verschiedene Dipeptide auftreten und zum anderen nicht in allen Blindwerten Dipeptide nachweisbar sind. Parallel zu den Peptidspaltungen wurden daher stets Blindwerte mit den Enzymen alleine durchgeführt. In den Blindwerten der Dipeptide mit Puffer waren bei Derivatisierung mit Isopropanol / Salzsäure (i.Prop. / HCl) oder Methanol / Salzsäure (MeOH / HCl) und Perfluorpropionsäure (PFPA) auch einzelne Aminosäuren nachweisbar, aber

ausschließlich nur solche, die auch in den Dipeptiden als Bausteine enthalten sind. Sie können entweder von Anfang an bereits als Verunreinigungen der Dipeptide vorhanden gewesen sein oder bei der Inkubation bzw. beim Derivatisieren entstanden sein. Anhand der Blindwerte mit Dipeptiden, DAP I und Puffer konnte gezeigt werden, daß DAP I eine Aminopeptidase-Nebenaktivität enthält, da gegenüber den oben genannten Blindwerten ohne Enzyme verstärkt Aminosauren nachweisbar waren. Diese Nebenaktivität bewirkte zudem überlappende und unvollständige Abspaltung einzelner Aminosäuren. Bei der DAP IV gelang die vollständige Abtrennung der Aminopeptidase-Aktivität während der Anreicherung durch Chromatographie an Gly-pro-AH-Sepharose. Im anschließend durchgeführten Blindwert mit DAP IV waren nur noch die Aminosäuren nachweisbar, die bereits in einer frisch hergestellten Dipeptidmischung ohne Puffer und ohne Enzyme nach dem sofortigen Derivatisieren gefunden worden waren.

Die Derivatisierung der Spaltprodukte erfolgte überwiegend mit methanolischer Salzsäure (MeOH / HCl) und Perfluorpropionsäureanhydrid (PFPA) zu den PFP-Dipeptidmethylestern. In den Vorversuchen wurde mit Dinitrofluorbenzol (DNFB) zu Dinitrophenyl-dipeptiden (DNP-Dipeptiden) derivatisiert, die aber bei der Identifizierung der C-terminalen Aminosäure im Dipeptid mit MS schlechtere Ergebnisse lieferten. Außerdem waren die Dünnschichtchromatogramme und die Dünnschichtelektropherogramme in der Regel nicht eindeutig interpretierbar. Die PFP-Aminosäure-(Dipeptid-)methylester(isopropylester) haben den Vorteil, daß sie bei der durch Elektronenstoß induzierten Fragmentation im MS auch bei Abwesenheit des Molekülions (M^+) in der Regel die Identifizierung von N-terminaler und C-terminaler Aminosäure im Dipeptid ermöglichen. Bei den Peptidspaltungen ergab sich, daß die Identifizierung der PFP-Dipeptid-(Aminosäure-)methylester(isopropylester) mit GC / MS wesentlich eindeutiger, empfindlicher und zeitsparender ist, als die Identifizierung der Dipeptide (Aminosäuren) bzw. deren

Derivate mit Dünnschichtchromatographie, Saulenchromatographie, Dunnschichtelektrophorese und HPLC. Die Spaltungen wurden bei pH 6,5 und 37° C durchgeführt, die verwendeten Enzymmengen lagen pro Enzym in der Regel zwischen 2 und 5 Unit / µMol Peptid. Die bisher erreichte Empfindlichkeit für die Identifizierung von Dipeptiden nach der enzymatischen Spaltung eines Peptides beträgt 1 nMol. Die Aminosäuresequenz kann derzeit mit 5 - 10 nMol eines Peptides ermittelt werden, wenn erstens die Aminosäurezusammensetzung bekannt ist und zweitens keine Aminosäuren im Peptid enthalten sind, bei denen noch Schwierigkeiten in der Derivatisierung oder in der Identifizierung bestehen (Asn, Gln, Arg, His, Trp). Durch Verwendung der FAB - MS - Methode zur Identifizierung der Spaltprodukte, bei der keine Derivatisierung der Peptide erforderlich ist, ist auch der Nachweis dieser Aminosäuren möglich. Bei der Spaltung eines Heptapeptides konnten die abhydrolisierten Dipeptide wegen der zu geringen Intensität zwar nur ungenugend identifiziert werden, aber die jeweils neu entstehenden Restpeptide waren eindeutig nachweisbar. Aufgrund ihrer Pseudomolekulionen (M +H) konnte dann die Sequenz ermittelt werden.

(1) J.K. MacDonald, C. Schwabe in
Proteinases in mammalian cells and tissues
Research Monographs in cell and tissue physiology 2
(1977) 311
Editors : A.J. Barett, J.T. Dingle
North-Holland Publishing Company
Amsterdam New York Oxford 1977

(2) Enzyme Nomenclature
Recommendations of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) and the International Union of Biochemistry (IUB)

(3) H.R. Gutman, J.S. Fruton
The Journal of Biological Chemistry 174 (1948) 851

(4) F.L. Huang, A.L. Tappel
Biochimica et Biophysica Acta 268 (1972) 527

(5) R.M. Metrione, A.G. Neves, J.S. Fruton
Biochemistry 5 (1966) 1597

(6) J.K. MacDonald, S. Ellis, T.J. Reilly
The Journal of Biological Chemistry 241 (1966) 1494

(7) R.M. Caprioli, W.E. Seifert
Biochemical and Biophysical Research Communications 64 (1975) 295

(8) W.E. Seifert, R.M. Caprioli
Biochemistry 17 (1978) 436

(9) H.C. Krutzsch, J.J. Pisano
Biochimica et Biophysica Acta 576 (1979) 280

(10) R.M. Metrione, N.L. MacGeorge
Biochemistry 14 (1975) 5249

(11) J.K. MacDonald, B.B. Zeitman, P.X. Callahan, S. Ellis
The Journal of Biological Chemistry 249 (1974) 234

(12) N. Izumiya, J.S. Fruton
The Journal of Biological Chemistry 218 (1956) 59

(13) H.C. Krutzsch, J.J. Pisano
Methods in Enzymology 47 (1977) 391

(14) R.J. Planta, J. Gorter, M. Gruber
Biochimica et Biophysica Acta 89 (1964) 511

(15) I.M. Voynick, J.S. Fruton
Biochemistry 7 (1968) 40

(16) J.S. Fruton, M.J. Mycek
Archives of Biochemistry and Biophysics 65 (1956) 11

(17) J. Gorter, M. Gruber
Biochimica et Biophysica Acta 198 (1970) 546

(18) J.S. Fruton, M.J. Mycek
Archives of Biochemistry and Biophysics 65 (1956) 11

(19) J.K. MacDonald, B.B. Zeitman, T.R. Reilly, S. Ellis
The Journal of Biological Chemistry 244 (1969) 2693

(20) J.K. MacDonald, T.J. Reilly, B.B. Zeitman, S. Ellis
Biochemical and Biophysical Research Communications
24 (1966) 771

(21) M.J. Mycek
Methods in Enzymology 19 (1970) 285

(22) V.K. Hopsu-Havu, P. Rintola
Histochemical Journal 1 (1968) 1

(23) W.T. Stauber, S. Ong
Journal of Histochemistry and Cytochemistry
30 (1982) 162

(24) R. Willstätter, E. Bamann
Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie
180 (1929) 127

(25) J.K. MacDonald, P.X. Callahan, B.B. Zeitman, S. Ellis
The Journal of Biological Chemistry 244 (1969) 6199

(26) F.L. Huang, A.L. Tappel
Biochimica et Biophysica Acta 236 (1971) 739

(27) J.K. MacDonald, P.X. Callahan, R.E. Smith, S. Ellis
in Tissue proteinases, chapter 4 (1971) 69
Editors : A.J. Barett, J.T. Dingle
North-Holland Publishing Company
Amsterdam

(28) R.M. Metrione, Y. Okuda, G.F. Fairclough
Biochemistry 9 (1970) 2427

(29) V.K. Hopsu-Havu, G.G. Glenner
Histochemie 7 (1966) 197

(30) V.K. Hopsu-Havu, S.R. Sarimo
Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie
348 (1967) 1540

(31) V.K. Hopsu-Havu, P.Rintola, G.G. Glenner
Acta Chemica Scandinavica 22 (1968) 299

(32) A. Barth, H. Schulz, K. Neubert
Acta biologica et medica germanica 32 (1974) 157

(33) J. Kenny, A.G. Booth, S.G. George, J. Ingram, D. Kershaw, E.J. Wood, A.R. Young
Biochemival Journal 155 (1976) 169

(34) K.M. Fukasawa, K. Fukasawa, B.Y. Hiraoka, M. Harada
Biochimica et Biophysica Acta 657 (1981) 179

(35) H.C. Krutzsch, J.J. Pisano
Biochimica et Biophysica Acta 576 (1979) 280

(36) K.M. Fukasawa, K. Fukasawa, M. Harada
Biochimica et Biophysica Acta 535 (1978) 161

(37) K.M. Fukasawa, K. Fukasawa, B.Y. Hiraoka, M. Harada
Experientia 39 (1983) 1005

(38) D. Eisenhauer, J.K. MacDonald
Federation Proceedings 41 (1982) 507

(39) T. Yoshimoto, T. Kita, M. Ichinose, D. Tsuru
Journal of Biochemistry 92 (1982) 275

(40) M. Ichinose, R. Maeda, T. Fukuda, B. Watanabe, T. Ishimaru, M. Izumi, S. Miyake, M. Takamori
Biochimica et Biophysica Acta 719 (1982) 527

(41) H. Oya, I. Nagatsu, M. Harada, T. Nagatsu
Experientia 26 (1970) 252

(42) T. Yoshimoto, R. Walter
Biochimica et Biophysica Acta 485 (1977) 391

(43) R.H. Erickson, A.M. Bella, E.J. Brophy, A. Kobata, Y.S. Kim
Biochimica et Biophysica Acta 756 (1983) 258

(44) K. Imai, T. Hama, T. Kato
Journal of Biochemistry 93 (1983) 431

(45) G. Kreil, L. Haiml, G. Suchanek
European Journal of Biochemistry 111 (1980) 49

(46) S. Gutschmidt, R. Gossrau
Histochemistry 73 (1981) 285

(47) R. Gossrau
Histochemistry 60 (1979) 231

(48) K.M. Fukasawa, K. Fukasawa, N. Sahara, M. Harada, Y. Kondo, I. Nagatsu
The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 29 (1981) 337

(49) H.Oya, I.Nagatsu, T. Nagatsu
Biochimica et Biophysica Acta 258 (1972) 591

(50) K. Kojima, T. Hama, T. Kato, T. Nagatsu
Journal of Chromatography 189 (1980) 233

(51) K. Iijima, K. Ando, M. Kishi, T. Nakashizuka,
T. Hayakawa
Journal of Dental Research 62 (1983) 289

(52) T. Kato, K. Iwase, T. Nagatsu, S. Sakakibara,
K. Fujita
Experientia 35 (1979) 20

(53) A.C. Feller
Histochemical Journal 14 (1982) 889

(54) T. Hama, M. Okada, K. Kojima, T. Kato, M. Matsuyama,
T. Nagatsu
Molecular and Cellular Biochemistry 43 (1982) 35

(55) A.F. Bury, R.J. Pennington
Biochemical Journal 145 (1975) 413

(56) T. Kato, T. Hama, T. Nagatsu
Journal of Neurochemistry 34 (1980) 602

(57) M. Hino, T. Nagatsu, S. Kakumu, S. Okuyama,
Y. Yoshii, I. Nagatsu
Clinica Chimica Acta 62 (1975) 5

(58) V.K. Hopsu-Havu, C.T. Jansen, M. Järvinen
Clinica Chimica Acta 28 (1970) 25

(59) W. Sterry
Zeitschrift für Hautkrankheiten 57 (1982) 282

(60) T. Hama, T. Nagatsu, S. Kobayashi, S. Azuma,
T. Miyachi, Y. Kumagai, T. Kato
Clinica Chimica Acta 113 (1981) 217

(61) T. Yoshimoto, D. Tsuru
Agricultural and Biological Chemistry 44 (1980) 1961

(62) T. Yoshimoto, D. Tsuru
Journal of Biochemistry 91 (1982) 1899

(63) M.P. Suarez Rendueles, J. Schwencke, N. Garcia
Alvarez, S. Gascon
FEBS Letters 131 (1981) 296

(64) D. Julius, L. Blair, A. Brake, G. Sprague, J. Thorner
Cell 32 (1983) 839

(65) K.M. Fukasawa, M. Harada
Archives of Biochemistry and Biophysics
210 (1981) 230

(66) H. Oya, M. Harada, T. Nagatsu
Archives of Oral Biology 19 (1974) 489

(67) A.M. Bella, R.H. Erickson, Y.S. Kim
Archives of Biochemistry and Biophysics
218 (1982) 156

(68) T. Kato, T. Hama, T. Nagatsu, H. Kuzuya,
S. Sakakibara
Experientia 35 (1979) 1329

(69) V.K. Hopsu-Havu, T.O. Ekfors
Histochemie 17 (1969) 38

(70) B. Labsch, J. Heins, H. Hilse, A. Barth, P. Oehme
Pharmazie 36 (1981) 161

(71) B. Svenson, M. Danielsen, M. Staun, L. Jeppesen,
O. Noren, H> Sjöström
European Journal of Biochemistry 90 (1978) 489

(72) W. Kreisel, R. Heussner, B. Volk, R. Büchsel,
W. Reutter, W. Gerok
FEBS Letters 147 (1982) 85

(73) E. Heymann, R. Mentlein
FEBS Letters 91 (1978) 360

(74) T. Kato, T. Nagatsu, K. Fukasawa, M. Harada,
I. Nagatsu, S. Sakakibara
Biochimica et Biophysica Acta 525 (1978) 417

(75) R.C. Görne, J. Heins, H. Hilse, P. Oehme, A. Barth
Pharmazie 38 (1983) 112

(76) W. Hoffmann, T.C. Bach, H. Seliger, G. Kreil
The EMBO Journal 2 (1983) 111

(77) M. Fuyamada, M. Hino, T. Nagatsu, K. Ogawa,
S. Sakakibara
Clinica Chimica Acta 74 (1977) 177

(78) J. Kojima, M. Kanatani, N. Nakamura, T. Kashiwagi,
F. Tojoh, M. Akiyama
Clinica Chimica Acta 107 (1980) 105

(79) J. Kojima, M. Kanatani, M. Kato, F. Tojoh,
J. Nakamura
Clinica Chimica Acta 93 (1979) 181

(80) K. Kumujita, M. Hirano, K. Tokunaga, I. Nagatsu, T. Nagatsu, S. Sakakibara
Clinica Chimica Acta 81 (1977) 215

(81) M. Hino, H. Fuyamada, T. Hayakawa, T. Nagatsu, H. Oya, Y. Nakagawa, T. Takemoto, S. Sakakibara
Clinical Chemistry 22 (1976) 1256

(82) N. Fujii, Y. Kasahara, T. Nagatsu
Clinical Chemistry 27 (1981) 1054

(83) Y. Kasahara, N.Fujii, H. Naka, T. Nagatsu
Clinical Chemistry 26 (1980) 1048

(84) Y. Kasahara, N. Fujii, H. Naka, T. Nagatsu
Biomedical Research 3 (1982) 265

(85) A. Morita, A. Bella, Y.S. Kim
Gastroenterology 78 (1980) 1226

(86) E.M. Danielsen, H. Sjöström, O. Noren
Biochemical Journal 210 (1983) 389

(87) J. Elovson
The Journal of Biological Chemistry 255 (1980) 5816

(88) A. Barth
Zeitschrift für Chemie 20 (1980) 39

(89) A. Barth, H. Mager, G. Fischer, K. Neubert, G. Schwarz
Acta biologica et medica germanica 39 (1980) 1129

(90) J. Heins, K. Neubert, B. Schneeweiss, A. Barth
Federation Proceedings 42 (1983) 1324

(91) M. Harada, K. Fukasawa, K. Fukasawa, T. Nagatsu
Biochimica et Biophysica Acta 705 (1982) 288

(92) H.C. Krutzsch
Methods in Enzymology 91 (1983) 511

(93) H.C. Krutzsch, J.J. Pisano in
Peptides : Proceedings of the 4. American Peptide Symposium om Chemistry, Structure and Biology (1975) 985
Editors : R. Walter, J. Meienhofer
New York

(94) P.X. Callahan, J.K. MacDonald, S. Ellis
Methods in Enzymology 25 (1972) 282

(95) P.X. Callahan, J.A. Shepard, T.J. Reilly, J.K. MacDonald, S. Ellis
Analytical Biochemistry 38 (1970) 330

(96) C.G. Honegger
Helvetica Chimica Acta 44 (1961) 173

(97) R.G. Whittaker, B.A. Moss
Analytical Biochemistry 110 (1981) 56

(98) R.L. Munier, A.M. Drapier, S. Meunier, P. Le Xuan
Chromatographia 14 (1981) 289

(99) S. Lin, L.A. Smith, R.M. Caprioli
Journal of Chromatography 197 (1980) 31

(100) R.M. Caprioli, W.E. Seifert, D.E. Sutherland
Biochemical and Biophysical Research Communications
55 (1973) 67

(101) P.X. Callahan, J.K. MacDonald, S. Ellis
Federation Proceedings 31 91972) 1105

(102) J.K. MacDonald, B.B. Zeitman, S. Ellis
Biochemical and Biophysical Research Communications
46 (1972) 62

(103) J.K. MacDonald, P.X. Callahan, S. Ellis
Methods in Enzyology 25 (1971) 272

(104) S.R. Burzynski
Analytical Biochemistry 70 (1976) 359

(105) B. Hartrodt, K. Neubert, G. Fischer, U. Demuth,
T. Yoshimoto, A. Barth
Pharmazie 37 (1982) 72

(106) G. Beisenherz, H.J. Boltze, T. Bücher, R. Czok,
K.H. Garbade, E. Meyer-Arendt, G. Pfleiderer
Zeitschrift für Naturforschung 8b (1953) 555

(107) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall
The Journal of Biological Chemistry 193 (1951) 265

(108) M.A.K. Markwell, S.M. Haas, L.L. Bieber, N.E. Tolbert
Analytical Biochemistry 87 (1978) 206

(109) Boehringer Mannheim GmbH, Kontroll-Labor
Biochemie Tutzing, Juni 1976, 1. Ausgabe
Aktivitätsbestimmung von Cathepsin C

(110) R.J. Planta, M. Gruber
Analytical Biochemistry 5 (1963) 360

(111) L. Vitale, M. Zubanovic, M. Abramic
Acta biologica et medica germanica 40 (1981) 1489

(112) J. Nagatsu, T. Nagatsu, T. Yamamoto, G.G. Glenner,
J.W. Mehl
Biochimica et Biophysica Acta 198 (1970) 255

(113) K. Weber, M. Osborn in
The Proteins 1 (1975) 179
Editors : H. Neurath, R.L. Hill
Academic Press, Third Edition (1976)
New York San Francisco London

(114) A.L. Shapiro, E. Vinuela, J.V. Maizel
Biochemical and Biophysical Research Communications
28 (1967) 815

(115) K. Weber, M. Osborn
The Journal of Biological Chemistry 244 (1969) 4406

(116) U.K. Laemmli
Nature 227 (1970) 680

(117) H.R. Maurer
Disk-Elektrophorese
Verlag Walter de Gruyter & Co (1968)

(118) LKB Bromma
Application Note 320

(119) B. Budowle, R.T. Acton, B.O. Barger
Analytical Biochemistry 118 (1981) 399

(120) S. Moore, W.H. Stein
Methods in Enzymology 6 (1963) 819

(121) D.H. Spackman, W.H. Stein, S. Moore
Analytical Chemistry 30 (1958) 1190

(122) J.R. Benson in
Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis
(1975) 1
Editor : R.N. Perham
Academic Press
London New York San Francisco

(123) Pharmacia Fine Chemicals
Recommended carbodiimide coupling procedure for
CH-sepharose 4 B and AH-sepharose 4 B
Nr 01-900-2-1167-01

(124) R.H. Erickson, Y.S. Kim
Biochimica et Biophysica Acta 743 (1983) 37

(125) P. Cuatrecasas
The Journal of Biological Chemistry 245 (1970) 3059

(126) N. Sharon, H. Lis
Science 177 (1972) 949

(127) K. Asperg, J. Porath
Acta Chemica Scandinavica 24 (1970) 1839

(128) K.M. Fukasawa, K. Fukasawa, B.Y. Hiraoka, M. Harada
Experientia 39 (1983) 1005

(129) L. Wofsy, B. Burr
Journal of Immunology 103 (1969) 380

(130) G.K. Ackers in
The Proteins 1 (1975) 42
Editors : H. Neurath, R.L. Hill
Academic Press, Third Edition (1976)
New York San Francisco London

(131) J.R. Witaker
Analytical Chemistry 35 (1963) 1950

(132) C.J. Gray, J. Boukouvalas, S.A. Barker
Tetrahedron 38 (1982) 1465

(133) M. Deffner, K.H. Deimer, E. Jaeger, P. Stelzel,
P. Thamm, G. Wendelberger, E. Wünsch in
Methoden der organischen Chemie Band XV/2
Synthese von Peptiden Teil II (1974) 237
Editor : E. Wünsch
Georg Thieme Verlag Stuttgart

(134) Y.A. Ovchinnikov, A.A. Kiryushkin
FEBS Letters 21 (1972) 300

(135) H.J. Förster, J.A. Kelley, H. Nau, K. Biemann in
Chemistry and Biology of Peptides (1972) 679
Editor : J. Meinhofer
Ann Arbor Science Publishers
Ann Arbor, Michigan 1972

(136) J.A. Kelley, H. Nau, H.J. Förster, K. Biemann
Biochemical and Biophysical Research Communications
55 (1973) 2

(137) M. Hartmann
Untersuchungen zu Sequenzierungen von Peptiden
Dissertation, Universität München, 1979

(138) R.F. Adams
Journal of Chromatography 95 (1974) 189

(139) G. Gamerith
Journal of Chromatography 256 (1983) 326

(140) G. Gamerith
Journal of Chromatography 256 (1983) 267

(141) Don Roach, G.W. Gehrke
Journal of Chromatography 44 (1969) 269

(142) Don Roach, G.W. Gehrke
Journal of Chromatography 43 (1969) 303

(143) C.W. Moss, M.A. Lambert, F.J. Diaz
Journal of Chromatography 60 (1971) 60

(144) F.J. March
Analytical Biochemistry 69 (1975) 420

(145) S.L. Mackenzie, L.R. Hogge
Journal of Chromatography 132 (1977) 485

(146) P. Felker
Journal of Chromatography 153 (1978) 259

(147) G.R. Walter (Editor)
Biochemical Applications of Mass-Spectrometry
Wiley-Interscience New York 1972 S. 387ff

(148) H.C. Krutzsch, J.J. Pisano
Biochemistry 17 (1978) 2791

(149) G.M. Schier, P.D. Bolton, B. Halpern
Biomedical Mass Spectrometry 3 (1976) 32

(150) H. Barber, R.S. Bordoli, R.D. Sedgwick, A.N. Tyler
Journal of the Chemical Society Chemical
Communications 1981 325

(151) F.H. Devienne, I. Roustan
Organic Mass Spectrometry 17 (1982) 173

(152) W. Schäfer in
Modern Methods in Protein Chemistry (1983) 337
Editor H. Tschesche
Walter de Gruyter & Co
Berlin New York

(153) D.H. Williams, C.V. Bradley, G. Bojesen
Biochemical Journal 201 (1982) 105

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Spektroskopie, unter Leitung von Prof. Dr. W. Schäfer durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. W. Schäfer danke ich sehr herzlich für sein persönliches Interesse an allen wissenschaftlichen und persönlichen Belangen, sowie für seine Ratschläge und ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. W. Schäfer und Frau I. Buhrow danke ich für die Durchführung der GC / MS Messungen.

Bei Frau Dr. T. Kleinschmidt bedanke ich mich für die Überlassung der Peptide für die Sequenzierungsversuche.

Bei Frau Dr. M. Hartmann, Frau E. Brose und Herrn J. Griffig möchte ich mich bedanken für die zahlreichen Diskussionsbeiträge und Einführungen in die biochemischen Arbeitstechniken.

Herrn Prof. Dr. T. Severin danke ich für die Vertretung dieser Arbeit bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Lebenslauf

Name	:	Helmut Gonschor
Geburtstag	:	1. April 1954
Staatsangehörigkeit	:	deutsch
Familienstand	:	verheiratet
Schulbildung	:	5 Jahre Volksschule 9 Jahre math.-naturw. Gymnasium
Wehrdienst	:	6 Monate
Studium	:	9 Semester Lebensmittelchemie an der Ludwig-Maximilians-Universität 1. Staatsexamen 1979 2 Semester Untersuchungsamt 2. Staatsexamen 1980

Seit 1981 Doktorand am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried.